



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
Luis Guillermo Ibarra Ibarra  
ESPECIALIDAD EN: OFTALMOLOGÍA

“BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES SEROLÓGICOS  
PROTEÓMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE GLAUCOMA  
PRIMARIO DE ÁNGULO DE ÁNGULO ABIERTO.”

## T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE MÉDICO ESPECIALISTA EN:

**OFTALMOLOGÍA**

PRESENTA:

**MARIANA PUERTO CÁMARA**

PROFESOR TITULAR Y ASESOR:

**DRA. FRANCISCA DOMÍNGUEZ DUEÑAS**



MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

**DRA. MATILDE ENRÍQUEZ SANDOVAL**  
DIRECTORA DE EDUCACIÓN EN SALUD

---

**DRA. XOCHIQUETZAL HERNÁNDEZ LÓPEZ**  
SUBDIRECTORA DE EDUCACIÓN MÉDICA

---

**DR. ALBERTO UGALDE REYES RETANA**  
JEFE DE SERVICIO DE EDUCACIÓN MÉDICA

---

**DRA. FRANCISCA DOMÍNGUEZ DUEÑAS**

PROFESOR TITULAR

ASESOR CLÍNICO

ASESOR METODOLÓGICO

## CONTENIDO

1. SINOPSIS	Página 5
2. MARCO TEÓRICO	Página 6
3. JUSTIFICACIÓN	Página 10
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	Página 10
5. HIPÓTESIS	Página 11
6. OBJETIVO GENERAL	Página 11
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	Página 11
7. METODOLOGÍA	Página 11
7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	Página 11
7.2 UNIVERSO DE TRABAJO	Página 12
7.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	Página 13
7.4 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	Página 14
7.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	Página 14
7.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA	Página 14
7.7 METODOLOGÍA Y DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS	Página 14
7.8 VARIABLES DE ESTUDIO.	Página 18
7.9 MÉTODOLÓGIA DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	Página 20
8. ASPECTOS ÉTICOS	Página 20
9. INFRAESTRUCTURA DISPONIBLE	Página 21
10. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	Página 22
11. RESULTADOS	Página 23
12. ANÁLISIS DE RESULTADOS	Página 28
13. CONCLUSIONES	Página 29
14. BIBLIOGRAFÍA	Página 30
15. ANEXOS	Página 32

## 1. SINOPSIS

El glaucoma primario de ángulo abierto es una neuropatía óptica progresiva multifactorial, y es una de las principales causas de ceguera irreversible en el mundo. El diagnóstico oportuno es fundamental para reducir la progresión a ceguera.

La búsqueda de biomarcadores moleculares para diagnóstico de glaucoma es un área de investigación emergente. El estudio y comparación del proteoma en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas permite tener una imagen dinámica de las proteínas expresadas en un momento dado y de esta manera identificar aquellas cuya presencia se correlaciona con determinados estadios patológicos. De esta manera es posible identificar proteínas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, así como la identificación de potenciales biomarcadores para diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma.

Aún con los conocimientos actuales sobre la fisiopatología involucrada en el desarrollo de glaucoma, no se han determinado y validado las moléculas capaces de funcionar como un biomarcador.

El presente es un estudio prospectivo, transversal, descriptivo y analítico.

Este trabajo es un estudio piloto, que dará pie a múltiples estudios posteriores, el objetivo es realizar un análisis proteómico del suero en pacientes con glaucoma y compararlo con controles sanos sin glaucoma, para identificar proteínas que puedan ser utilizadas como biomarcadores para diagnóstico temprano.

Se realizó a los pacientes seleccionados exploración oftalmológica completa, campimetría estática y tomografía de coherencia óptica de fibras nerviosas. Los pacientes fueron clasificados en sanos, sospechosos de glaucoma y con diagnóstico confirmado de glaucoma. Se realizó toma de muestras, las cuales han iniciado su procesamiento, se cuantificaron proteínas. Posteriormente se realizará el análisis proteómico, usando las técnicas de electroforesis en geles de dos dimensiones y espectrometría de masas. Los perfiles proteómicos obtenidos se analizarán con el fin de detectar un patrón de expresión diferencial en los pacientes con diagnóstico de glaucoma.

La concentración de proteínas séricas no tiene correlación con el diagnóstico, estamos en espera de resultados del análisis proteómico para conocer el perfil de expresión proteico de cada paciente.

## 2. MARCO TEÓRICO

El glaucoma primario de ángulo abierto es una neuropatía óptica progresiva que se caracteriza por la muerte de las células ganglionares de la retina y sus axones que forman el nervio óptico. La consecuencia funcional es el deterioro progresivo del campo visual, que generalmente empieza en la periferia media superior y puede progresar a una visión tubular y ceguera en casos avanzados. Es una enfermedad poligénica y compleja desde el punto de vista genético, en cuyo origen intervienen múltiples factores y cambios epigenéticos.<sup>1</sup>

El aumento de la presión intraocular (PIO) es el principal factor de riesgo y uno de los mecanismos fisiopatogénicos más estudiados,<sup>2,3</sup> resulta del incremento de la resistencia al flujo de salida del humor acuoso a través del trabéculo, por cambios ultraestructurales en la matriz extracelular de la red trabecular.<sup>4-6</sup> Otros factores de riesgo también descritos son la edad avanzada, la raza, el antecedente familiar de glaucoma, la miopía, grosor corneal central disminuido y la disminución de la presión de perfusión.<sup>1</sup>

La fisiopatología de la muerte de las células ganglionares aún no se conoce por completo. De manera clásica existen dos teorías: la mecánica, en la cual se menciona que el aumento de la presión intraocular ocasiona un daño mecánico sobre la cabeza del nervio óptico causando interrupción del flujo axoplásmico a nivel de la lámina cribosa; el bloqueo del transporte axonal disminuye el aporte de factores neurotróficos necesarios para la vitalidad de la célula neuronal, como por ejemplo, el factor de crecimiento derivado del cerebro. Esta privación de neurotrofinas dispara una cascada de eventos celulares que culminan en la apoptosis.<sup>7-9</sup> La teoría vascular se basa en que existe una disfunción vascular a nivel de la microcirculación de la cabeza del nervio óptico, lo que ocasiona un daño por hipoperfusión.<sup>10</sup> El ambiente de hipoxia promueve la liberación de radicales libres, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno que generan un ambiente de estrés oxidativo que promueve la muerte celular.<sup>11</sup> La degeneración inicial de algunas células ganglionares provoca un ambiente de toxicidad por la liberación de glutamato excitotóxico lo cual genera daño celular secundario.<sup>12</sup>

Los astrocitos son la principal célula glial de la cabeza del nervio óptico, proporcionan el soporte tisular de los axones, estimulan la liberación de factores neurotróficos y antioxidantes y promueven la degradación de los depósitos extracelulares anormales de proteínas. De manera normal los astrocitos permanecen en un estado estable, pero pueden volverse reactivos en respuesta a una lesión o enfermedad y pueden exacerbar y propagar el daño al tejido neural. Se ha propuesto que el aumento de la presión intraocular puede promover la reactivación anormal de la glia a nivel de la lámina cribosa del nervio óptico. El papel que juegan los astrocitos en la degeneración del tejido circundante se cree ocurre mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno, proteasas, citoquinas y ácido nítrico.<sup>13</sup> La disfunción del sistema inmunológico también se ha propuesto como uno de los mecanismos generadores del daño neurodegenerativo secundario a la reactivación glial. Una interacción compleja de acontecimientos celulares

incluyendo activación/disfunción glial, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, y disfunción de la respuesta inmunológica, puede amplificar el proceso de daño primario y contribuir a la progresión de la neurodegeneración.<sup>14,15</sup>

A pesar de todo el avance en el conocimiento de la fisiopatología del daño en glaucoma, aun no se conoce por completo la serie de mecanismos moleculares, celulares e intercelulares que van ocurriendo en cascada y terminan en la apoptosis de las células ganglionares de la retina.

### ***Pruebas Diagnósticas***

El diagnóstico de glaucoma se establece con la evidencia del daño estructural del nervio óptico y la evaluación de la función visual con el campo visual. Actualmente existen dos modalidades de pruebas diagnósticas, las funcionales y las estructurales.<sup>16</sup> Las pruebas funcionales consisten en el examen del campo visual, evalúan la integridad y la función de la vía visual desde la capa de células ganglionares en la retina hasta la corteza visual; la perimetría automática estandarizada es la prueba funcional aceptada en consenso para el diagnóstico y estadificación del glaucoma.<sup>17</sup> Las pruebas estructurales son estudios de imagen que evalúan de manera objetiva el disco óptico, la capa de fibras nerviosas y capa de células ganglionares; realizan mediciones cuantitativas de estas estructuras. La tomografía óptica coherente de dominio espectral es hoy en día el estudio estructural más aceptado para el diagnóstico de glaucoma (SD-OCT). La evidencia del daño estructural midiendo la pérdida de la capa de fibras nerviosas peripapilar y la capa de células ganglionares con SD-OCT actualmente se ha convertido en el estándar de referencia para el diagnóstico temprano de glaucoma.<sup>18,19</sup>

### ***Biomarcadores moleculares en glaucoma***

Un biomarcador molecular es un parámetro que puede ser medido objetivamente y evaluado como indicador de un proceso fisiológico o patológico y cuyos requisitos fundamentales son una elevada especificidad y sensibilidad.<sup>20</sup> Se han propuesto diferentes tipos de biomarcadores moleculares de acuerdo a los mecanismos fisiopatológicos del glaucoma:

1. Biomarcadores de estrés oxidativo: se han encontrado en tejidos oculares y en sangre de pacientes con glaucoma, disminución de las defensas antioxidantes (Ácido ascórbico, vitamina D, Vitamina A) e incremento de moléculas pro-oxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, óxido nítrico, 8-hidroxi-2deoxiguanosina, malondialdeido).<sup>21</sup>



2. Biomarcadores de inflamación y mediadores inmunológicos. Se han reportado diferentes alteraciones en los mediadores de la respuesta inflamatoria e inmunológica en sangre, humor acuoso y tejidos oculares de pacientes con glaucoma, lo que sugiere una actividad anormal del sistema inmunológico. Se han encontrado autoanticuerpos contra antígenos de retina y nervio óptico en suero de pacientes con GPAA, así como niveles aumentados de factor de necrosis tumoral alfa, factor transformador de crecimiento beta, molécula de adhesión endotelial-1, interleucinas 1-alfa y 8 en humor acuoso de pacientes con glaucoma. El análisis proteómico de retina en ojos de pacientes con glaucoma, ha revelado expresión y regulación diferencial de componentes del complemento.<sup>21</sup>

3. Biomarcadores de moléculas pro-apotóticas. La apoptosis es la vía final común de muerte de las células ganglionares de la retina. Se han encontrado niveles elevados de mediadores de la apoptosis como las Caspasas 2, 8, 9, 10, 14, Bax (proteína de membrana mitocondrial reguladora de apoptosis), calcio, homocisteína, diadenosina y tetrafosfato en sangre de pacientes con glaucoma.<sup>21</sup>

## **Proteómica**

El desarrollo de las ciencias genómicas y las diferentes tecnologías con aplicación biológica hacen posible el estudio de la información genética contenida en un organismo en distintos niveles: el estructural, que describe la secuencia de los nucleótidos que conforman un genoma; y el funcional, que analiza la expresión de los productos funcionales del gen, el ARN mensajero (transcriptoma) y las proteínas (proteómica). La proteómica es una rama de la genómica que estudia los proteomas, es decir todas las proteínas que se expresan a partir del genoma de un organismo. Es el estudio a gran escala de las proteínas, de su estructura, su localización, su función, y la cuantificación de su expresión.<sup>22</sup> La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente; de esta forma, se pueden encontrar proteínas cuya presencia o alteración se correlaciona con determinados estadios patológicos, ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la enfermedad, así como la identificación de potenciales biomarcadores con fines diagnósticos y/o pronósticos.<sup>23</sup>

## **Proteómica y glaucoma**

Estudios recientes de glaucoma usando técnicas de análisis proteómico han dado como resultado una lista de proteínas expresadas de forma diferencial en muestras de pacientes con glaucoma y en modelos animales de glaucoma experimental. El análisis global de la expresión de proteínas en glaucoma ha sido seguido por un análisis del

proteoma de células específicas como células del trabéculo, células ganglionares de la retina y astrocitos.<sup>24</sup>

Duan y colaboradores estudiaron el proteoma diferencial en muestras de humor acuoso de 5 pacientes con GPAA que fueron sometidos a cirugía filtrante y lo compararon con 5 controles pareados sin glaucoma que se operaron de catarata. Utilizaron el método de Bradford para determinar la concentración total de proteínas en humor acuoso y analizaron el perfil de separación por electroforesis en gel de dos dimensiones. Usaron tinción de plata para evaluar las densidades de los spots y finalmente los péptidos fueron aislados e identificados por espectrometría de masas. Las proteínas en las que se observó incremento significativo en pacientes con glaucoma fueron Prostaglandina H2D-isomerasa, precursor de caspasa 14, transferina, Cysteina C y Transtiretina. Los autores concluyen que estas proteínas podrían ser potenciales biomarcadores para diagnóstico de GPAA.<sup>25</sup>

El objetivo de un biomarcador para diagnóstico es ser obtenido mediante una técnica no invasiva, por esto la muestra de humor acuoso no es la ideal, pues implica una intervención quirúrgica con el riesgo potencial de complicaciones. La muestra de sangre es fácil de obtener y con riesgo mínimo, por lo tanto es la ideal. Con las técnicas actuales para depletar albumina e inmunoglobulinas que son las proteínas más abundantes, el hallazgo de proteínas en concentraciones proporcionalmente bajas es posible.

Tezel y colaboradores analizaron muestras serológicas de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto, glaucoma de tensión normal y glaucoma secundario a pseudoexfoliación, en busca de biomarcadores serológicos. Mediante un análisis mediante 2D-LC-MS/MS, identificaron 325 proteínas, de las cuales sólo 22 estuvieron presentes en las muestras de pacientes con glaucoma. Las proteínas identificadas incluyeron mediadores inmunológicos y componentes de la señalización de muerte celular, los autores las proponen como potenciales biomarcadores. Debido a la evidencia del involucro del sistema inmunológico en el desarrollo del daño glaucomatoso, también realizaron un análisis inmunoproteómico serológico de pacientes con glaucoma con el objetivo de buscar anticuerpos contra antígenos específicos e identificaron una lista de proteínas antigénicas como biomarcadores candidatos. De estos candidatos se encuentran títulos elevados de forma significativa de 3 proteínas, AIF, CREB-binding protein y ephrina.<sup>26</sup>

González Iglesias y colaboradores realizaron un análisis proteómico serológico en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto, glaucoma secundario a pseudoexfoliación y controles sanos, e identificaron 35 proteínas serológicas con expresión diferencial en los pacientes con glaucoma. Los autores proponen a 17 de ellas como biomarcadores candidatos dentro de las que cabe señalar la apolipoproteína A-I, el complemento C3, y la serotransferrina.<sup>27</sup>

Sin embargo estos estudios han sido realizados en pacientes bajo tratamiento farmacológico glaucomatoso, y es conocido que esto puede modificar el patrón de expresión proteica diferencial.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El glaucoma primario de ángulo abierto es una de las principales causas de ceguera irreversible en el mundo y tiene una prevalencia del 2 al 4 % en mayores de 40 años.<sup>28-30</sup> El hecho de que la pérdida visual producida por esta enfermedad es irreversible hace necesaria la búsqueda de métodos de detección precoz, así como el desarrollo biotecnológico de nuevas alternativas de tratamiento. En los últimos años se han volcado los esfuerzos para desarrollar estudios y tecnología que apunten a este propósito.

La búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico de glaucoma es un área emergente de oportunidad en investigación. Con el avance hoy en día de las técnicas de proteómica como la espectrometría de masas y el desarrollo de la bioinformática y descripción del proteoma humano, se están identificando candidatos biomarcadores, sin embargo se requiere de estudios adicionales, en diferentes grupos poblacionales, que incluyan pacientes sin tratamiento, en diferentes estadios de la enfermedad, primordialmente en etapas tempranas, para identificar biomarcadores y validarlos en una muestra poblacional grande.<sup>24</sup>

La identificación de las proteínas que intervienen en las diversas etapas de la enfermedad en diferentes grupos poblacionales ayudará a comprender las bases moleculares y la naturaleza de la patología; de igual modo, estas proteínas identificadas pueden utilizarse como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico de la enfermedad, y por otro lado hace posible la identificación de nuevos blancos terapéuticos para un mejor diseño de fármacos.<sup>24</sup>

No existen estudios del proteoma serológico en pacientes mexicanos con glaucoma, es necesario el estudio del proteoma en diferentes grupos poblacionales, pues sabemos que existen importantes diferencias raciales en la enfermedad.

### **4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los estudios experimentales recientes han logrado muchos avances en la comprensión de la neurodegeneración glaucomatosa, sin embargo aún se desconocen los mecanismos moleculares claves que inician y propagan la lesión neuronal en las células ganglionares de la retina, así como la interacción entre las diferentes vías moleculares, y la contribución de cada una a la pérdida estructural y funcional.<sup>24</sup>

Los métodos diagnósticos actuales en glaucoma tienen pobre sensibilidad y especificidad en etapas tempranas y están diseñados para detectar enfermedad cuando ya está presente un daño anatómico o funcional que es irreversible. Los estudios de imagen estructurales tienen la limitante de ser dependientes de operador, de requerir medios transparentes y no son confiables en variantes anatómicas normales de la disposición y

tamaño del disco óptico como ocurre en pacientes con miopía ó creciente escleral. Además, la disponibilidad de los equipos es limitada por su alto costo y no están accesibles en todos los centros médicos de salud en la población. Por otro lado, el campo visual tiene la limitante de depender del desempeño y la cooperación del paciente, es un estudio que requiere una curva de aprendizaje y para ciertos grupos etarios puede ser difícil de realizar.<sup>17</sup>

El uso de biomarcadores obtenidos con un método no invasivo podría ser una alternativa útil para el diagnóstico temprano de glaucoma, sin embargo aún con los conocimientos actuales sobre la fisiopatología involucrada en el desarrollo de glaucoma, no se han determinado y validado las moléculas capaces de funcionar como biomarcador.<sup>20,21</sup>

## **5.- HIPÓTESIS**

El perfil de expresión proteica serológico en pacientes mexicanos con GPAA es diferente que el de pacientes sanos y puede ser utilizado para la identificación de biomarcadores diagnósticos.

## **6.- OBJETIVO GENERAL**

- Realizar un análisis proteómico del suero de pacientes mexicanos con GPAA temprano y compararlo con controles sanos sin glaucoma.

### **6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar el perfil de expresión proteico serológico de pacientes mexicanos con GPAA
- Identificar posibles biomarcadores serológicos proteómicos en pacientes con diagnóstico de GPAA para el desarrollo de una prueba diagnóstica

## **7.- METODOLOGIA**

7.1.- Diseño del estudio: Prospectivo, transversal, descriptivo y analítico

7.2.- Descripción del universo de trabajo: Pacientes mexicanos mayores de 40 años, con diagnóstico de glaucoma primario de ángulo abierto, así como controles sanos sin glaucoma

7.3.- Criterios de inclusión:

Casos:

1. Pacientes mexicanos con por lo menos dos generaciones de familiares nacidos en México.
2. Mayores de 40 años.
3. De sexo masculino o femenino.
4. Con capacidad visual igual o mejor de 20/40.
5. Con un error refractivo de +5.00 a -5.00 de equivalente esférico
6. Con diagnóstico de glaucoma primario de ángulo abierto definido por:
  - i. Daño estructural glaucomatoso característico del nervio óptico.
  - ii. Con disminución de la capa de fibras nerviosas y capa de células ganglionares medida con tomografía de coherencia óptica de dominio espectral.
  - iii. Con daño campimétrico característico de glaucoma.
7. Sin otra patología ocular.

Controles:

1. Pacientes mexicanos con al menos dos generaciones de familiares nacidos en México.
2. Mayores de 40 años.
3. De sexo masculino o femenino.
4. Con capacidad visual igual o mejor a 20/40 en ambos ojos.
5. Con un error refractivo de +5.00 a -5.00 de equivalente esférico
6. Con la presión intraocular normal en al menos dos tomas con diferencia de 24 horas.
7. Con el disco óptico a la exploración oftalmológica de características normales.
8. Con capa de fibras nerviosas normal en todos los sectores medidas por tomografía de coherencia óptica.
9. Con campos visuales sin alteraciones con la perimetría automática estandarizada.
10. Sin patología ocular, a excepción de catarata incipiente.

#### 7.4.- Criterios de eliminación

1. Pacientes que no asistan a los estudios del abordaje diagnóstico.
2. Pacientes que no deseen participar en el estudio.
3. Pacientes que no firmen el consentimiento informado para la toma de muestra de sangre.

#### 7.5.-Criterios de exclusión:

1. Tratamiento médico farmacológico con hipotensores oculares.
2. Tratamiento médico oftalmológico o sistémico.
3. Antecedente personal de Diabetes Mellitus.
4. Alguna otra patología ocular que pudiera afectar el perfil proteómico o la capacidad de realizar los estudios.

#### 7.6.- Tamaño de muestra:

20 Casos incidentes de GPAA con daño leve y 20 Controles sanos sin patología ocular ni sistémica.

Se aceptarán, por tratarse de estudio piloto, a pacientes con diagnóstico final de “sospecha de glaucoma”, con el fin de estudiar sus características proteómicas.

#### 7.7.- Metodología y descripción de procedimientos

Se cumplirán los lineamientos de la Declaración de Helsinki, obteniendo consentimiento informado de todos los casos y controles, tras explicar apropiadamente las posibles complicaciones de la toma de muestra.

##### **Fases del estudio**

##### **A) Selección y estudio de los pacientes para realizar el análisis proteómico**

20 casos incidentes de GPAA y 20 controles sanos pareados por edad y género

Se seleccionarán 20 pacientes del servicio de glaucoma del Instituto Nacional de Rehabilitación, a los que se les integre el diagnóstico de glaucoma primario de ángulo abierto y cumplan con los

criterios de inclusión, se les invitará a participar en el estudio, se recolectarán sus muestras serológicas previo consentimiento informado y se les indicará tratamiento hipotensor farmacológico.

Los casos de glaucoma serán pareados en género y edad con pacientes sanos sin glaucoma.

## Procedimientos

1. **Reclutamiento de pacientes:** Se realizará una campaña de detección oportuna de glaucoma, invitando a la población asintomática a realizarse una revisión oftalmológica y se realizará una convocatoria en centros de salud para acudir a la campaña de detección oportuna.

2. **Revisión oftalmológica:** A los participantes reclutados se les realizará una historia clínica y revisión oftalmológica completa

a. HISTORIA CLÍNICA. Se realizará una historia clínica detallada

- i) Ficha de identificación: Se tomarán los datos de identificación: Nombre, edad, género, lugar de nacimiento y lugar de residencia
- ii) Anamnesis: Se realizará un interrogatorio dirigido y específico para identificar los factores de riesgo para glaucoma, así como la presencia de otras patologías.
- iii) Antecedentes heredo-familiares: Se identificará en el paciente la presencia de antecedentes familiares con glaucoma directos o indirectos de primera y segunda generación
- iv) Antecedentes personales patológicos: Se preguntará sobre los antecedentes patológicos personales y específicamente sobre enfermedades crónico-degenerativas: diabetes, hipertensión arterial sistémica, migraña.
- v) Antecedentes oftalmológicos: Se preguntará sobre los antecedentes generales de patología oftalmológica y específicamente cirugías intraoculares previas, uso de colirios, esteroides tópicos o sistémicos y trauma ocular.
- vi) Uso de medicación tópica o sistémica: Se preguntará sobre el uso de medicación tópica ocular y/o sistémica en curso.
- vii) Padecimiento actual: Se preguntará el motivo de consulta y la sintomatología del paciente; específicamente se interrogará sobre síntomas como disminución de la visión, cuadros de dolor ocular, cefalea, percepción de colores alrededor de las fuentes de luz y restricción subjetiva del campo visual.

b) EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA

- i) Agudeza visual/ Capacidad visual: Se efectuará la medición de la agudeza visual de ambos ojos con la cartilla de Snellen y se realizará refracción utilizando el autorrefractó-queratómetro.
- ii) Biomicroscopia. Exploración del segmento anterior con lámpara de hendidura con el fin de identificar cualquier signo de glaucoma secundario u otra patología ocular.

Específicamente se buscarán datos de: pseudoexfoliación, pigmento, catarata, sinequias, inflamación aguda o crónica, recesión angular

- iii) Paquimetría corneal. Se medirá el grosor corneal con paquímetro ultrasónico
- iv) Tonometría. Se tomará la presión intraocular con el tonómetro de aplanación de Goldmann.
- v) Gonioscopia. Se realizará la evaluación del ángulo camerular para identificar todas las estructuras del sistema trabecular y determinar si se encuentra abierto o cerrado. Se clasificará con el método de Shaffer.
- vi) Oftalmoscopia posterior. Se realizará la evaluación del polo posterior bajo dilatación farmacológica con un lente aéreo de 78 D y se identificarán las características de la retina, de la mácula y de la papila o cabeza del nervio óptico. Se identificará las siguientes características específicas de la papila: Tamaño del disco, excavación: relación copa-disco, asimetría de la excavación del disco, anillo neuroretiniano, pérdida de la relación normal de las porciones de la papila, atrofia peripapilar, capa de fibras nerviosas, trayecto de los vasos, hemorragias en astillas, muescas en el anillo neuroretiniano.

**3. Pruebas diagnósticas:** A los participantes que cumplan con los criterios de inclusión y sean sospechosos de glaucoma por las características clínicas se les dará cita para las pruebas diagnósticas:

- a. Se les realizará a los pacientes PERIMETRÍA AUTOMÁTICA ESTANDARIZADA (SAP) con el campímetro HUMPHREY: estrategia 24-2 SITA.
- b. Se les realizará una Tomografía de coherencia óptica de fibras nerviosas de dominio espectral: Se medirá el grosor en micras de la capa de fibras nerviosas peripapilar, con el Spectralis- OCT (Tomografía óptica coherente) de Heidelberg Engineering
- c. Se les solicitará a los pacientes un perfil pre-quirúrgico y una valoración por medicina interna con exámenes de laboratorio y gabinete.

**4. Integración diagnóstica y toma de muestras:** A los participantes se les dará una cita con el médico especialista en glaucoma con el resultado de las pruebas diagnósticas y a los pacientes con el diagnóstico de glaucoma primario de ángulo abierto que cumplan con los criterios de inclusión se les invitará a participar en el estudio, previo consentimiento informado se les tomara la muestra de sangre y se les indicará tratamiento farmacológico de ser necesario.

## **B) Análisis proteómico serológico**



## I. Pacientes y Muestras Biológicas

Se usarán 40 muestras (20 controles y 20 casos) de sangre de pacientes seleccionados, se realizarán triplicados de cada muestra biológica, que serán reclutados en el Instituto Nacional de Rehabilitación, cumplan con los criterios de inclusión y que acepten donar una muestra de sangre mediante consentimiento informado.

## II. Toma de Muestra

Se tomarán 10 ml de sangre en tubos vacutainer con K2-EDTA 10.8mg BD y con inhibidores de proteasas, se dejará a temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente se centrifugarán a 1000 RPM por 10 min a 4°C. Se recupera el sobrenadante en alícuotas de 500 µl, y se almacenan a -80°C, hasta su uso.

## III. Depleción de Albúmina e IgG

Se eliminará la albumina e inmunoglobulina (IgG) de la muestra de plasma, se utilizará una columna comercial Albumin/IgG Depletion Cartridge de la marca QIAGEN. Este método consiste en la eliminación del 90 % de proteínas de gran abundancia en plasma como albúmina e IgG a través de una columna de alta afinidad (anticuerpos monoclonales) con el empleo de un sistema de cromatografía líquida (HPLC Alliance Waters). Las muestras de plasma se diluirán en una proporción 1:4, se realizarán inyecciones de 25µl de plasma diluido con PBS (Buffer de fosfatos, pH 7.2, mca. INVITROGEN), en un flujo de 0.5 ml/min, fluirá a través de la columna. Las proteínas abundantes se unirán a los anticuerpos inmovilizados de la resina, y permitirá el paso de plasma depletado, se recolectarán las fracciones y almacenarán a -20°C para su posterior análisis. Posteriormente se eliminarán sustancias interferentes como detergentes, sales, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos fenólicos, etc..., de la muestra que contiene las proteínas con el kit comercial 2 D Clean Up (GE).

## IV. Cuantificación de Proteínas

Se cuantificará la proteína total con un kit comercial DC de Bio Rad, es un ensayo colorimétrico. Este ensayo se basa en una reacción de proteína con la solución alcalina de tartrato de cobre y el reactivo Folin. La reacción entre la proteína y el cobre en medio alcalino, produce una reducción del reactivo Folin, por la interacción proteína-cobre. El desarrollo del color es debe a la interacción de los aminoácidos tirosina y triptófano. Se llevará a cabo según las instrucciones del kit comercial 2D Quant (GE). Las lecturas se leerán en un lector de microplaca ajustado a una  $\lambda$  de 460nm.

#### IV. Geles de primera dimensión ó isoelectroenfoque (IEF)

La electroforesis bidimensional es una técnica que permite analizar mezclas complejas de proteínas procedentes de muestras biológicas como plasma ó suero. El primer paso consiste en separar las proteínas por su punto isoeléctrico (pI) mediante un isoelectroenfoque en geles de gradiente de pH inmovilizados en condiciones desnaturizantes. Para realizar este protocolo se tomará una alícuota de 300 µg de proteína, se mezcla con el buffer de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2%, buffer IPG 0.5% pH3-10 NL, azul de bromofenol al 0.002%, DTT 0.56 M) para completar un volumen final de 250 a 300 µl. A cada alícuota se le agregará 1 µl de buffer IPG y 0.00056 g de DTT. Una vez hecha la mezcla esta se depositará en uno de los carriles de la cámara de rehidratación, evitar las burbujas y repartir uniformemente. Se colocará la tira immobline DryStrip de 18 cm con gradiente de pH3-10NL (General Electric Healthcare), hacia abajo en contacto con la solución de rehidratación, para que toda la superficie del gel quede hidratada y asegurar la migración de las proteínas. Posteriormente se cubrirá con 3 ml de aceite mineral Plus One (Amersham Biosciences), con la finalidad de evitar la evaporación de la muestra y cristalización de la urea. Se dejará rehidratar la tira de 14-18 horas a temperatura ambiente. El isoelectroenfoque consiste en depositar las tiras de gradiente pI en una cámara de porcelana del sistema Ettan IPGphor III IEF (General Electric Healthcare), se adicionarán 9 ml de aceite mineral a cada carril y se colocará la tira en uno de los carriles de la cámara de porcelana, con la parte del gel hacia arriba, enseguida se colocará una almohadilla de papel filtro previamente humedecida con 130 µl de agua destilada. Los voltajes utilizados para el isoelectroenfoque serán de 500, 1000 y 8000 voltaje/h. Transcurrido el tiempo de isoelectroenfoque, los geles se equilibrarán en un buffer de equilibrio (Tris-HCl pH 8.8 50mM, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, agua miliQ suplementado con DTT (50 mg/5ml) durante 15 minutos y posteriormente con iodoacetamida (125 mg/5 ml) durante el mismo tiempo.

#### V. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida SDS-PAGE ó segunda dimensión

Después de equilibrar los geles de primera dimensión, se realizará la separación de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE en geles al 12.5 %, con un gel concentrador al 4%. La separación de las proteínas se realizará a un voltaje constante de 150 V, utilizando el buffer de corrida (Tris-Base 25 mM, SDS 0.1%, Glicina 192 mM, agua destilada), durante 5 a 8 horas. Después de la electroforesis, las proteínas contenidas en los geles se tiñen con azul de Coomassie G-250 (Bio Safe).

#### VI. Identificación y análisis de spots en los geles

Los geles teñidos con Coomassie serán escaneados en el Scanner LabScan™ (General Electric Healthcare), el análisis de los spots se realizará en un software específico para geles de doble dimensión (ImageMaster 2D Platinum 6.0 Amersham Bioscience).

Los spots diferenciales entre los diferentes grupos de geles se seleccionarán y se cortarán y se hará la digestión en la estación de trabajo Ettan Spot Handling Workstation (General Electric Healthcare). Posteriormente se identificarán por MALDI-TOF/TOF Analyzer (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight tandem mass spectrometry/4800 AB Sciex).

Los resultados se reportarán en términos de un “score” de probabilidad, se hará la identificación en tres motores de búsqueda ProteinPilot™ AB Sciex, MASCOT (Steen y Mann, 2004) (Matrixscience, KU), por duplicado para asegurar con mayor exactitud el listado de proteínas como posibles biomarcadores de la patología.

### C) Selección y análisis de posibles candidatos biomarcadores

Se analizarán los resultados con los péptidos identificados en las muestras de los casos y de los controles. Se seleccionará a las proteínas candidatas para funcionar como biomarcador diagnóstico.

## 7.8.- Descripción de las variables de estudio y sus escalas de medición

### Variables a medir

#### I. Variables del análisis proteómico

Variable	Definición	Tipo de variable	Escala de medición
Cuantificación de proteínas	Cantidad total de proteínas en suero.	Cuantitativa continua.	Miligramos por decilitro.
Proteínas en suero	Nombres de la proteína identificadas	Categórica	nominal

#### II. Variables Independientes Clínicas

Variable	Definición	Tipo de variable	Escala de medición
Edad	Años Cumplidos de vida al	Cuantitativa	Años

	momento de entrar al estudio	continua	
Género	Condición orgánica que distingue al hombre de la mujer	Dicotómico	Masculino Femenino
Lugar de Nacimiento	Estado y ciudad de nacimiento	Categórica	Nominal
Antecedentes familiares de glaucoma	Antecedentes de familiar directo con diagnóstico de glaucoma	Dicotómico	Si No
Capacidad Visual	Agudeza visual con corrección óptica. Límite espacial de discriminación visual	Cuantitativa continua	Log Mar
Refracción	Valor dióptrico del punto remoto, expresado con signo contrario	Cuantitativa continua	Equivalente esférico Dioptías positivas o negativas
Presión intraocular	fuerza ejercida por el humor acuoso y vítreo sobre la superficie del ojo	Cuantitativa continua	Milímetros de mercurio.
Paquimetría corneal	Grosor de la cornea central	Cuantitativa continua	Micras
Excavación clínica de la papila	Excavación de la papila: Relación copa disco vertical	Cuantitativa continua	0.1 a 1
Campos visuales (SAP)	Prueba psicofísica que evalúa la sensibilidad a los estímulos luminosos presentados en el área del campo visual. Perimetría automática estandarizada	Cuantitativa continua	Decibeles
OCT de fibras nerviosas	Grosor de la capa de fibras nerviosas peripapilar por sectores Grosor de la capa de células ganglionares macular	Cuantitativa continua	Micras

### 7.9.- Análisis estadístico propuesto

Para comparar la media de las variables continuas dimensionales en los dos grupos se utilizara la prueba de T-de Student para muestras independientes. Para las variables que no cumplan los criterios de normalidad se realizara prueba de Mann-Whitney.

## **8.- ASPECTOS ÉTICOS**

En acuerdo a los principios que establecen las “Buenas Prácticas Clínicas” (BCP), de conformidad con los enunciados en la declaración de Helsinki (última revisión en 2013), y de los lineamientos establecidos en la ley, donde debe prevalecer el bienestar individual de los sujetos sometidos a estudio por sobre los intereses de la ciencia y la comunidad, éste protocolo se llevara a cabo con la estricta consideración de los principios éticos y científicos reconocidos y respeto por la integridad física y mental de los pacientes involucrados; protegiendo la vida, la salud, la dignidad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información de las personas que participan en investigación.

En conformidad con los principios éticos para las investigaciones médicas, nos aseguraremos de resguardar la intimidad de los individuos y la confidencialidad de la información recabada, permaneciendo anónima la información proporcionada por los participantes en todo reporte relacionado a la investigación.

De acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación en salud, se trata de una Investigación con riesgo mínimo. La obtención de los datos se realizará a través de procedimientos comunes de exploración y de diagnóstico rutinarios, como son la revisión oftalmológica bajo lámpara de hendidura, toma de la presión intraocular y revisión de fondo de ojo bajo dilatación farmacológica, así como la toma de una muestra de sangre. La toma de las muestras cumplirá con estrictas normas de higiene. El procesamiento y desecho de las mismas será de acuerdo a la normatividad actual.

A los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión se les invitará a participar en el protocolo de investigación y se harán de su conocimiento los objetivos, procedimientos, riesgos y beneficios del estudio (Anexo 1). Aquellos que proporcionen su consentimiento informado de manera voluntaria serán incluidos (Anexo 2).

De conformidad con el Artículo 14 y 15 de la declaración de Helsinki, el proyecto será enviado para consideración, comentario, consejo y aprobación, a los comités de Ética y de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación y del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

## **9.- INFRAESTRUCTURA DISPONIBLE**

- a) Servicio de oftalmología con el equipo necesario para poder llevar a cabo el estudio clínico de los pacientes. Contamos con equipos de campos visuales.
- b) Procesamiento de las muestras. El estudio proteómico de las muestras se realiza en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, que cuenta con las instalaciones, tecnología y personal capacitado en espectrometría de masas necesarias para realizarlo.
- c) La tomografía de Coherencia Óptica de Fibras Nerviosas, se realiza en el Sanatorio Oftalmológico Mérida, que cuenta con el equipo necesario.

## 10. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Meses	1	3	6	9	12	18	24
Registro ante el comité de investigación y ética.	X						
Organización de infraestructura y recursos materiales		X					
Convocatoria para participar en el estudio en población		X					
Selección y estudio de los pacientes para realizar el análisis proteómico			X				
Toma y preparación de muestras			X				
Procesamiento de muestras				X			
Revisión de resultados del análisis proteómico					X		
Análisis de resultados						X	
Informe final y Publicación							X

## 11. RESULTADOS PRELIMINARES

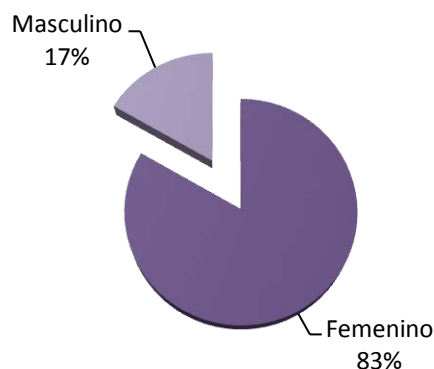
Se ha valorado al momento un total de 43 pacientes, que corresponden a 7 masculinos y 36 femeninos. De los anteriores, han sido incluidos en el estudio 30 pacientes, tras descartar a aquellos que no cumplieran con los criterios. De los pacientes incluidos se han eliminado un total de 6 por no completar el protocolo diagnóstico y no acudir a citas posteriores.

La tabla 1 describe las características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio. En el gráfico número 1 se exponen las proporciones de pacientes correspondientes a género femenino y masculino. En el gráfico número 2 se observa la distribución de pacientes por grupos de edad.

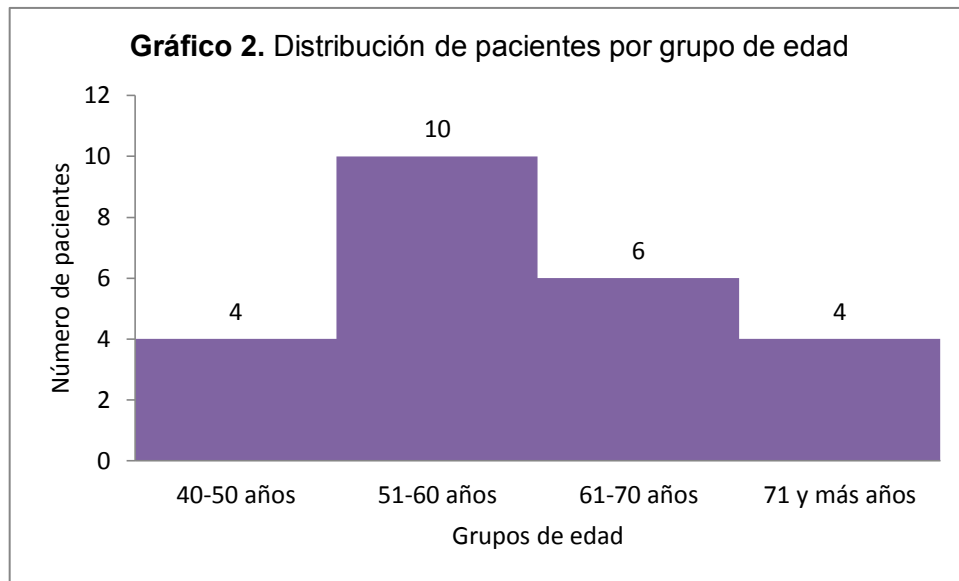
**Tabla 1.**

Número de paciente	Nombre (Iniciales)	Edad	Género	Estado de procedencia
1	E. M, C. H.	71	Femenino	Guerrero
2	L.N.C	79	Femenino	D.F.
3	L.P.P.	58	Femenino	D.F.
4	Z.E.R.G.	66	Femenino	D.F.
5	G.G.D.M.	65	Femenino	D.F.
6	C.R.H.	71	Femenino	D.F.
7	M.N.L.	52	Masculino	Estado de México.
8	A.M.V	69	Masculino	Guerrero.
9	M.T.A.R.	54	Femenino	D.F.
10	S.M.V.	56	Femenino	D.F.
11	J.B.M.M.	66	Masculino	D.F.
12	E.K.V.R.	43	Femenino	D.F.
13	L.A.S.A.	62	Masculino	D.F.
14	E.L.V.	41	Femenino	D.F.
15	M.T.R.	58	Femenino	Michoacán
16	M.A.J.	42	Femenino	Guerrero
17	D.O.E.	56	Femenino	D.F.
18	B.O.E.	48	Femenino	D.F.
19	M.G.R.M.	19	Femenino	D.F.
20	M.C.J.G.	66	Femenino	Guanajuato.
21	M.M.	56	Femenino	D.F.
22	M.E.H.F.	59	Femenino	D.F.
23	P.N.C.	75	Femenino	D.F.
24	M.A.E.C.	60	Femenino	Michoacán

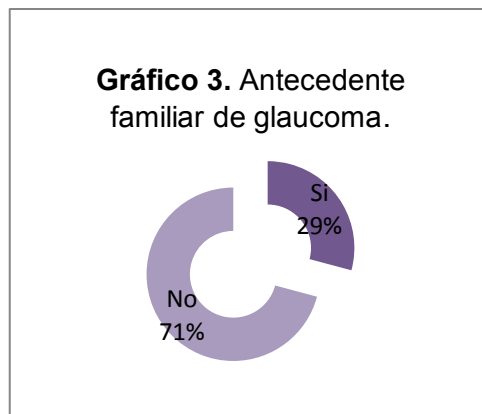
**Gráfico 1.** Porcentajes de pacientes correspondientes a género Masculino y Femenino



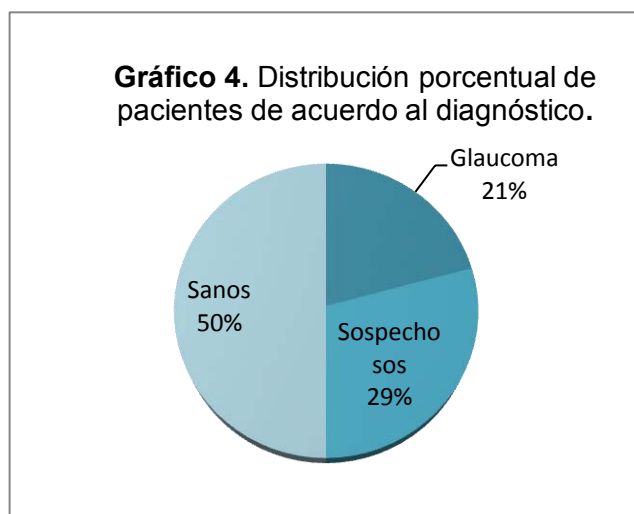




En el gráfico 3 se presenta la proporción de pacientes incluidos en el estudio con antecedente familiar de glaucoma positivo.



En el gráfico 4 se expone la distribución porcentual de pacientes incluidos de acuerdo al diagnóstico como caso de glaucoma, sospechoso de glaucoma o sano; tras la exploración oftalmológica y analizar los resultados de la tomografía de coherencia óptica de fibras nerviosas y el campo visual.



Se han realizado 19 tomografías de coherencia óptica de la capa de fibras nerviosas a los pacientes incluidos (38 ojos). Por medio de este estudio se han confirmado 4 casos de glaucoma, en 7 pacientes se ha hecho el diagnóstico de caso “sospechoso de glaucoma” y se ha confirmado como “sanos” a 8 pacientes. El grosor promedio de la capa de fibras nerviosas para los 38 ojos se presenta en la tabla 2.

Número de paciente	Grosor de la capa de fibras nerviosas OD / P>5% P<5% P<1%	Grosor de la capa de fibras nerviosas OI / P>5% P<5% P<1%	Diagnóstico del caso.
1	89.33 Dentro de límites normales	91.75 Dentro de límites normales	Glaucoma
2	98.44 Dentro de límites normales	123.48 Dentro de límites normales	Sano
3	106.84 Dentro de límites normales	102.74 Dentro de límites normales	Sano
4	90.02 Dentro de límites normales	95.12 Dentro de límites normales	Sospechoso
5	86.44 Límitrofe	86.14 Límitrofe	Sospechoso
6	82.24 Dentro de límites normales	74.94 Fuera de límites normales	Glaucoma
7	119.17 Dentro de límites normales	119.5 Dentro de límites normales	Sano
8	65.27 Fuera de límites normales	63.87 Fuera de límites normales	Glaucoma
9	125.85 Dentro de límites normales	129.46 Dentro de límites normales	Sano
10	81.9 Fuera de límites normales	59.65 Fuera de límites normales	Glaucoma
11	95.52 Dentro de límites normales	101.3 Dentro de límites normales	Sospechoso
12	112.42 Dentro de límites normales	113.2 Dentro de límites normales	Sano
13	95.21 Dentro de límites normales	109.65 Dentro de límites normales	Sospechoso
15	104.32 Dentro de límites normales	108.84 Dentro de límites normales	Sano
16	98.59 Dentro de límites normales	98.52 Dentro de límites normales	Sospechoso
20	103.81 Dentro de límites normales	115.92 Dentro de límites normales	Sospechoso
21	106.92 Dentro de límites normales	109.72 Dentro de límites normales	Sano
22	115.64 Dentro de límites normales	111.68 Dentro de límites normales	Sano
23	81.59 Límitrofe	99.54 Dentro de límites normales	Sospechoso

En la tabla número 3 se presentan los grosores promedio de la capa de células ganglionares para los 38 ojos que cuentan con tomografía de coherencia óptica de fibras nerviosas.

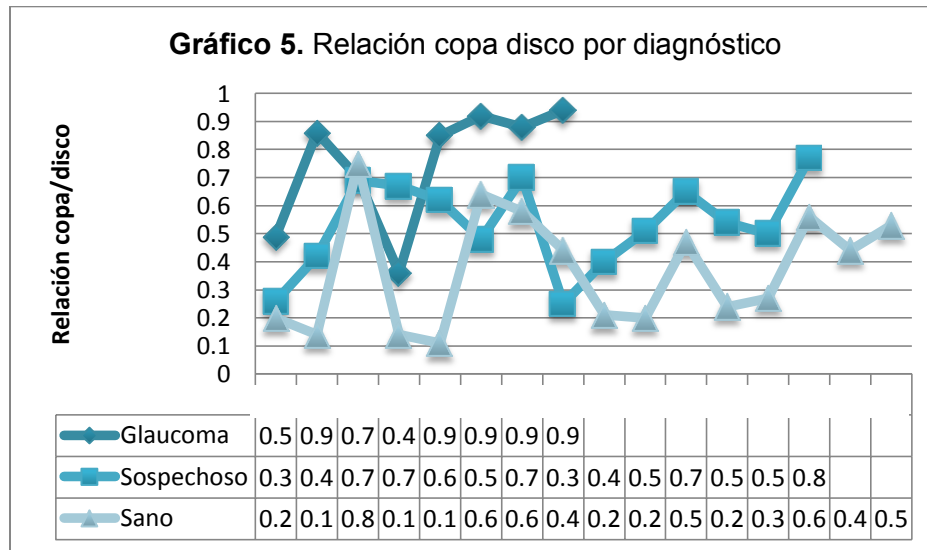
Número de paciente	Grosor de la capa de células ganglionares OD / P>5% P<5% P<1%	Grosor de la capa de células ganglionares OI / P>5% P<5% P<1%	Diagnóstico del caso.
1	94.16 Dentro de límites normales	89.49 Dentro de límites normales	Glaucoma
2	90.87 Dentro de límites normales	87.55 Dentro de límites normales	Sano
3	103.56 Dentro de límites normales	100.34 Dentro de límites normales	Sano
4	90.8 Dentro de límites normales	95.1 Dentro de límites normales	Sospechoso
5	88.56 Dentro de límites normales	90.71 Dentro de límites normales	Sospechoso
6	84.28 Dentro de límites normales	82.76 Dentro de límites normales	Glaucoma
7	104.46 Dentro de límites normales	101.83 Dentro de límites normales	Sano
8	86.91 Dentro de límites normales	86.06 Dentro de límites normales	Glaucoma
9	104.09 Dentro de límites normales	102.59 Dentro de límites normales	Sano

10	86.76	Dentro de límites normales	78.8	Limítrofe	Glaucoma
11	82.48	Dentro de límites normales	85.43	Dentro de límites normales	Sospechoso
12	100.92	Dentro de límites normales	98.45	Dentro de límites normales	Sano
13	88.44	Dentro de límites normales	90.13	Dentro de límites normales	Sospechoso
15	93.83	Dentro de límites normales	93.93	Dentro de límites normales	Sano
16	87.89	Dentro de límites normales	86.65	Dentro de límites normales	Sospechoso
20	89.63	Dentro de límites normales	97.51	Dentro de límites normales	Sospechoso
21	98.8	Dentro de límites normales	99.78	Dentro de límites normales	Sano
22	98.56	Dentro de límites normales	94.45	Dentro de límites normales	Sano
23	80.54	Limítrofe	77.37	Limítrofe	Sospechoso

En la tabla número 4 se presenta la relación copa/disco reportada por tomografía de coherencia óptica para cada ojo. El gráfico 5 agrupa la relación de copa/disco según el diagnóstico de "Glaucoma", "Sospechoso" o "Sano". Se observa claramente la asociación entre la relación copa/disco y el diagnóstico final.

**Tabla 4.**

Número de paciente	Relación copa/disco OD	Relación copa/disco OI	Diagnóstico del caso.
1	0.49	0.36	Glaucoma
2	0.2	0.21	Sano
3	0.14	0.2	Sano
4	0.26	0.25	Sospechoso
5	0.42	0.4	Sospechoso
6	0.86	0.85	Glaucoma
7	0.75	0.47	Sano
8	0.7	0.92	Glaucoma
9	0.14	0.24	Sano
10	0.88	0.94	Glaucoma
11	0.69	0.51	Sospechoso
12	0.11	0.27	Sano
13	0.67	0.65	Sospechoso
15	0.64	0.56	Sano
16	0.62	0.54	Sospechoso
20	0.48	0.5	Sospechoso
21	0.58	0.44	Sano
22	0.44	0.53	Sano
23	0.7	0.77	Sospechoso

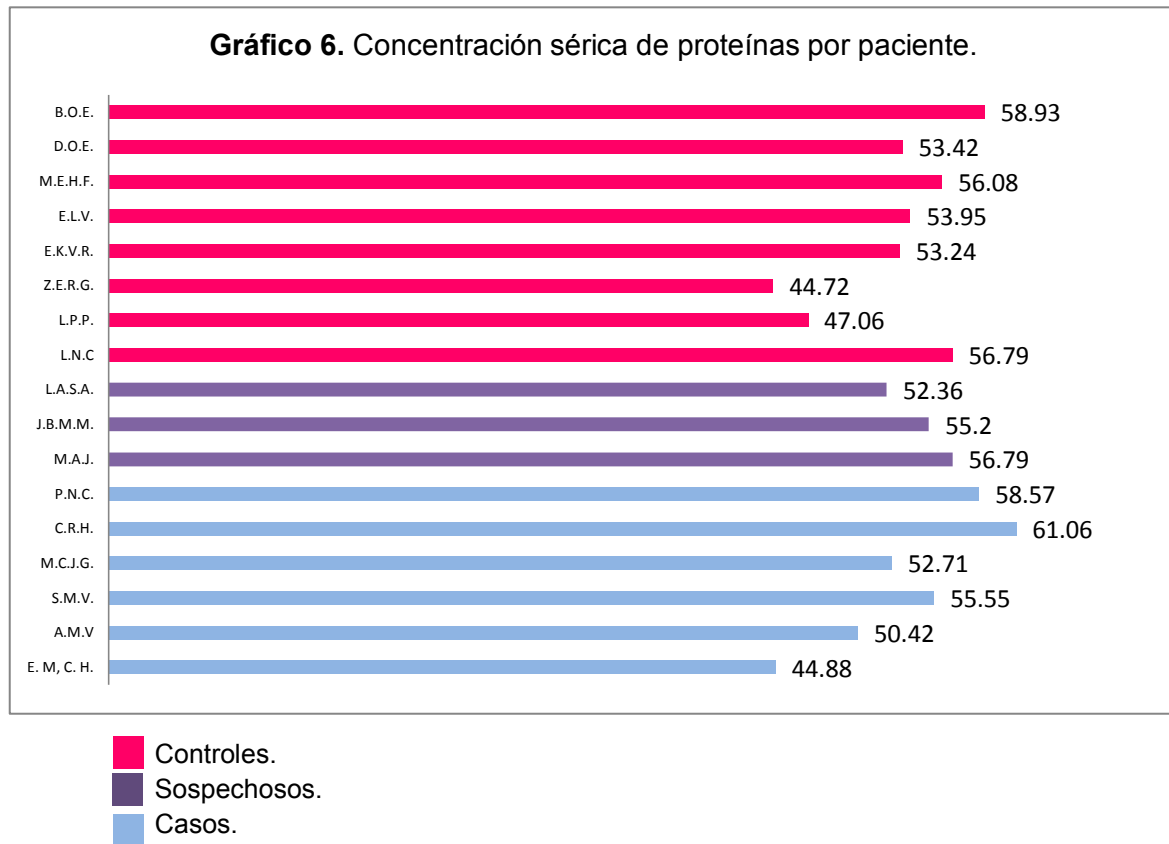


A continuación se presenta el grosor de la capa de fibras nerviosas por sector de un ejemplo de paciente para cada grupo.

Se ha realizado toma de muestra de sangre a un total de 18 pacientes, una de las cuales fue descartada por hemólisis. Se centrifugaron las muestras, se agregó inhibidor de proteasas al suero y posteriormente se dividieron en alícuotas de 250 microlitros. A estas muestras se les realizó cuantificación de proteínas. La tabla 5 presenta la mencionada cuantificación para cada paciente, así como el diagnóstico final del caso como “Caso” (Glaucoma), “Sospechoso” o “Control” (Sano).

Tabla 5.					
Número de paciente	Paciente	Edad	Género	Diagnóstico	Concentración de proteínas
1	E. M. C. H.	71	FEM	CASO	44.88 UG/UL
8	A.M.V	69	MAS	CASO	50.42 UG/UL
10	S.M.V.	56	FEM	CASO	55.55 UG/UL
20	M.C.J.G.	66	FEM	CASO	52.71 UG/UL
6	C.R.H.	71	FEM	CASO	61.06 UG/UL
23	P.N.C.	75	FEM	CASO	58.57 UG/UL
16	M.A.J.	42	FEM	SOSPECHOSO	56.79 UG/UL
11	J.B.M.M.	66	MAS	SOSPECHOSO	55.2 UG/UL
13	L.A.S.A.	62	MAS	SOSPECHOSO	52.36 UG/UL
2	L.N.C	79	FEM	CONTROL	56.79 UG/UL
3	L.P.P.	58	FEM	CONTROL	47.06 UG/UL
4	Z.E.R.G.	66	FEM	CONTROL	44.72 UG/UL
12	E.K.V.R.	43	FEM	CONTROL	53.24 UG/UL
14	E.L.V.	41	FEM	CONTROL	53.95 UG/UL
22	M.E.H.F.	59	FEM	CONTROL	56.08 UG/UL
17	D.O.E.	56	FEM	CONTROL	53.42 UG/UL
18	B.O.E.	48	FEM	CONTROL	58.93 UG/UL

En el gráfico 6 se presenta la concentración de proteínas por paciente. En color rosa se sombreen las barras correspondientes a pacientes “control”, en violeta las barras de pacientes “sospechosos” y en azul las barras correspondientes a pacientes “caso”.



## 12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

De los 24 pacientes incluidos en el estudio al momento, 50% corresponden a controles, de acuerdo a lo esperado por la selección de pacientes. El estudio de tomografía de coherencia óptica ha confirmado el diagnóstico de glaucoma en 4 casos (De 19 estudios realizados), es decir, 21%; esta proporción elevada se atribuye a la invitación a participar en el estudio y selección de pacientes caso de entre los individuos que acuden a consulta de primera vez en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Se hizo una invitación al personal del instituto a participar como voluntarios en una campaña de diagnóstico temprano de glaucoma, ésta invitación fue respondida principalmente por mujeres, lo que explica la alta proporción de femeninos en los pacientes seleccionados.

Se encuentra pendiente parte importante del procesamiento de muestras: electroforesis de proteínas y espectrometría de masas; los cuales nos servirán para determinar que proteínas se encuentran presentes en el suero de los pacientes, y realizar finalmente un análisis del patrón de expresión diferencial. Por el momento, en este estudio piloto, contamos con la concentración protéica de cada paciente, y no observamos correlación con el diagnóstico como “caso”, “control” o “sospecha”.

### **13. CONCLUSIONES**

- No existe correlación entre la concentración protéica total en suero de los pacientes de la muestra con el diagnóstico de “glaucoma”, “sospecha” o “sano”.
- Está pendiente el resultado del estudio proteómico completo, con el que conseguiremos identificar las proteínas presentes en el suero de los pacientes incluidos y comparar el patrón de expresión entre los grupos; para cumplir con el objetivo de este estudio piloto.

#### 14. BIBLIOGRAFIA

1. Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, Alward WL. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med*. 2009 Mar 12;360(11):1113-24.
2. Kass MQA, Heuer DK, Higginbotham EJ, et al. The ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120:701-13.
3. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hymann L, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1268-79.
4. Grant WM. Further studies on facility of flow through the trabecular meshwork. *Arch Ophthalmol*. 1958 Oct; 60(4):523-33.
5. Speakman JS, Leeson TS. Site of obstruction to aqueous outflow in chronic simple glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 1962 Jun; 46(6):321-35.
6. Alvarado JA, Yun AJ, Murphy CG. Juxtacanalicular tissue in primary open angle glaucoma and in nonglaucomatous normals. *Arch Ophthalmol*. 1986 Oct; 104(10):1517-28.
7. Zeimer RC, Ogura Y. The relation between glaucomatous damage and optic nerve head mechanical compliance. *Arch Ophthalmol*. 1989 Aug;107(8):1232-4.
8. Minckler DS, Bunt AH, Johanson GW. Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977 May;16(5): 426-41
9. Quigley HA, Anderson DR. The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest Ophthalmol*. 1976 Aug;15(8): 606-16.
10. Harris A, Rechtman E, Siesky B, Jonescu-Cuypers C, McCranor L, Garzosi HJ. The role of optic nerve blood flow in the pathogenesis of glaucoma. *Ophthalmol Clin North Am*. 2005 Sep;18(3):345-53.
11. Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol*. 2008 Dec;2(4):879-89.
12. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1996 Mar;114(3):299-305.
13. Johnson EC, Morrison JC. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J Glaucoma*. 2009 Jun-Jul;18(5):341-53.
14. Nickells RW. From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. *Can J Ophthalmol*. 2007 Apr;42(2):278-87.
15. Wax MB. The case for autoimmunity in glaucoma. *Exp Eye Res*. 2011 Aug;93(2):187-90.

16. Sharma P, Sample PA, Zangwill LM, Schuman JS. Diagnostic tools for glaucoma detection and management. *Surv Ophthalmol*. 2008 Nov;53 Suppl1:S17-32
17. Mowatt G, Burr JM, Cook JA, Siddiqui MA, Ramsay C, Fraser C, Azuara-Blanco A, Deeks JJ. OAG Screening Project. Screening tests for detecting open-angle glaucoma: systematic review and meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Dec;49(12):5373-85.
18. Mardin CY, Jünemann AG. The diagnostic value of optic nerve imaging in early glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001 Apr;12(2):100-4.
19. Lisboa R, Leite MT, Zangwill LM, Tafreshi A, Weinreb RN, Medeiros FA. Diagnosing Preperimetric Glaucoma with Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*. 2012 Aug 7.
20. Golubnitschaja O, Flammer J. What are the biomarkers for glaucoma? *Surv Ophthalmol*. 2007 Nov;52 Suppl 2:S155-61. Review.
21. Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, García-Medina JJ, Gallego-Pinazo R. Evaluation of presumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Feb;13(1):98-107.
22. Williams KL. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis*. 1999 Apr-May;20(4-5):678-88. Review.
23. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207. Review.
24. Tezel G. A proteomics view of the molecular mechanisms and biomarkers of glaucomatous neurodegeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2013 Feb 5.
25. Duan X, Xue PI Wang h', Dong Z, Lu Q, Yang F. Proteomic analysis of aqueous humor from patients with primary open angle glaucoma, *Mol Vis*, 2010 Dec 18;16:2839-46.
26. Tezel G, Thornton IL, Tong MG, Luo C, Yang X, Cai J, Powell DW, Soltau JB, Liebmann JM, Ritch R. Immunoproteomic analysis of potential serum biomarker candidates in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Dec 13;53(13):8222-31.
27. González-Iglesias H, Álvarez L, García M, Escribano J, Rodríguez-Calvo PP, Fernández-Vega L, Coca-Prados M. Comparative proteomic study in serum of patients with primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma. *J Proteomics*. 2014 Feb 26;98:65-78.
28. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006 Mar;90(3):262-7.
29. Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Oct;47(10):4254-61
30. Varma R, Ying-Lai M, Francis BA, Nguyen BB, Deneen J, Wilson MR, Azen SP; Los Angeles Latino Eye Study Group. Prevalence of open-angle glaucoma and ocular hypertension in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmology*. 2004 Aug;111(8):1439-48.



## 15. ANEXOS

### Anexo 1

#### MANUAL INFORMATIVO PARA EL PACIENTE

Para su participación en la investigación titulada: “**Búsqueda de biomarcadores serológicos proteómicos para el diagnóstico de Glaucoma Primario de Ángulo Abierto**”, que se llevará a cabo en el Instituto Nacional de Rehabilitación.

Nota importante: Este documento, es complementario del documento titulado “Carta de consentimiento informado”; ambos deberán en posesión suya (en formato original) antes de que usted pueda tomar la decisión de formar parte de esta investigación. De este modo garantizamos que se le ha proporcionado toda la información necesaria para poder tomar la mejor decisión respecto a su participación en esta investigación.

#### INTRODUCCIÓN

Se le hace una cordial invitación para participar la investigación médica sobre biomarcadores para el diagnóstico de Glaucoma.

El glaucoma es una enfermedad del nervio óptico que está asociado a un aumento de la presión intraocular. El nervio óptico lleva la información visual al cerebro, por lo tanto el daño de sus fibras puede disminuir la visión y sin tratamiento puede terminar en ceguera. De hecho el glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible en el mundo.

Los factores de riesgo más importantes para desarrollar la enfermedad son el aumento de la presión intraocular, la miopía, tener mas de 40 años, el antecedente familiar de glaucoma y el uso de gotas que contengan cortisona.

El glaucoma es una enfermedad que generalmente no produce síntomas o molestias, es decir es una enfermedad que permanece silenciosa hasta cuando se afecta la visión de manera irreversible. Se ha reportado que el 50% de las personas con glaucoma no lo sabe y cuando se llega al diagnóstico es demasiado tarde.

La detección sólo se puede realizar con la evaluación del fondo de ojo y exámenes específicos. Los exámenes necesarios para confirmar el glaucoma son de dos tipos: estudios funcionales y estudios estructurales. Los estudios funcionales sirven para saber si se ha afectado la función

visual, y se llaman campimetría o campo visual. Los estudios estructurales sirven para saber si se ha dañado el nervio óptico, y son estudios de imagen como la tomografía de coherencia óptica.

Una vez que se realiza el diagnóstico de glaucoma, el tratamiento consiste en bajar la presión intraocular. Es una enfermedad que no se cura, pertenece al grupo de enfermedades que se denominan crónicas degenerativas, y por lo tanto requiere un control por el médico especialista de forma permanente; si esto se lleva a cabo de manera adecuada disminuye el riesgo de pérdida de la visión de manera sustancial

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN MÉDICA**

El objetivo del estudio es ampliar el conocimiento sobre la enfermedad, para poder desarrollar en un futuro nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento. En este estudio se investigará el perfil de proteínas en suero de pacientes con glaucoma y se comparará con el de personas sanas.

Se le ha seleccionado para participar porque cumple con las características requeridas.

Para decidir si participa o no, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los procedimientos, riesgos y beneficios con el fin tomar una decisión informada. Este formato le dará información detallada acerca del estudio de investigación y un miembro del equipo de investigadores lo discutirá con usted. Le informaremos de todos los aspectos de esta investigación incluyendo sus objetivos, los posibles beneficios y riesgos que tendrá si decide participar. Al final se le pedirá que forme parte del proyecto de manera voluntaria y de ser así, firmará la carta de consentimiento informado.

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este formato.

## **PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN MÉDICA**

1. Se obtendrá información acerca de su historia clínica y se realizará una revisión oftalmológica completa que consiste en toma de agudeza visual, refracción y examen bajo microscopio.

2. Se le realizará toma de la presión intraocular, previa aplicación de gotas de anestesia.
3. Se le aplicarán gotas para dilatar la pupila y poder realizar la evaluación del fondo de ojo completo
4. En una segunda visita se le realizarán las pruebas diagnósticas de campos visuales y tomografía de nervio óptico.
5. Se le tomará una muestra de sangre.
6. El tiempo que durará su participación en el estudio será el que lleve realizar los procedimientos anteriores, en dos días separados.

## **RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN**

El resultado del estudio nos permitirá ampliar el conocimiento de la enfermedad para poder desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento.

## **RIESGOS E INCONVENIENTES**

Este estudio de investigación es de riesgo mínimo pues se le realizarán procedimientos comunes que consisten en exámenes físicos y diagnósticos rutinarios en la exploración oftalmológica. Usted puede presentar efectos secundarios mínimos por la aplicación de las gotas como pueden ser ardor, visión borrosa y molestia a la luz; sin embargo estos efectos serán sólo transitorios y no dejan ninguna secuela en el ojo.

La toma de las muestras cumplirá con estrictas normas de higiene que garanticen su seguridad. Con éste procedimiento es posible que sienta dolor leve, presente sangrado mínimo y formación de equimosis (moretones). El procesamiento y desecho de las mismas será de acuerdo a la normatividad actual.

## **BENEFICIOS PARA USTED**

Este estudio le dará el beneficio de saber si usted tiene mayor riesgo de desarrollar glaucoma o si ya tiene la enfermedad. Además conocerá su estado de salud ocular y podrá recibir recomendaciones de acuerdo a los hallazgos en su revisión.

## **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

### **DERECHO A ABANDONAR LA INVESTIGACIÓN**

Usted es libre de decidir si participa o no en este estudio de investigación. Si decide participar, puede cambiar de opinión y retirarse del estudio en el momento que lo decida. Si decide no participar, o si se retira, no afectará su relación con los médicos de su hospital tratante.

### **CONTACTO PARA INFORMACION ADICIONAL**

Si usted tiene alguna pregunta o duda acerca de este estudio, puede contactar al investigador responsable o principal o algún otro miembro del equipo de investigación.

Investigador Responsable:

Dra. Francisca Domínguez Dueñas

Firma: \_\_\_\_\_

## Anexo 2.

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### BUSQUEDA DE BIOMARCADORES SEROLÓGICOS PROTEÓMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO,

#### JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN MÉDICA

El glaucoma es una enfermedad del nervio óptico que está asociado a un aumento de la presión intraocular. El nervio óptico lleva la información visual al cerebro, por lo tanto el daño de sus fibras puede disminuir la visión y sin tratamiento puede terminar en ceguera. El glaucoma es una enfermedad que generalmente no produce síntomas o molestias, es decir es una enfermedad que permanece silenciosa hasta cuando se afecta la visión de manera irreversible. Los estudios diagnósticos son poco accesibles a la población general, y resultan positivos únicamente cuando ya existe daño al nervio óptico.

#### OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN MÉDICA

Ampliar el conocimiento sobre la enfermedad, para poder desarrollar en un futuro nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento. En este estudio se investigará el perfil de proteínas en suero de pacientes con glaucoma y se comparará con el de personas sanas.

Yo, \_\_\_\_\_, he discutido sobre la investigación médica con la Dra. Francisca Domínguez Dueñas, y declaro lo siguiente:

- I. He recibido información clara por escrito y entendido el propósito de esta investigación médica con los potenciales riesgos y beneficios que conlleva participar en ella.
- II. Comprendo que de participar en el estudio, se me tomará una muestra de sangre venosa; la cual será analizada. También se me realizarán estudios de detección de glaucoma.
- III. Se han atendido todas mis dudas acerca de la participación en la investigación, y entiendo que todas las dudas acerca de mi participación en el futuro también serán respondidas.
- IV. Mi participación en esta investigación es voluntaria.

- V. Entiendo que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento sin perder ninguno de los beneficios a los cuales normalmente tendría derecho en el Instituto Nacional de Rehabilitación si no fuera parte de ningún protocolo.
- VI. Entiendo que obtengo como beneficio de participar en la investigación, el conocer mi estado de salud ocular, recibir un diagnóstico de ser el caso y recomendaciones de tratamiento.
- VII. Comprendo que con la toma de muestra de sangre es posible que sienta dolor leve, presente sangrado mínimo y formación de moretones. Existe muy bajo riesgo de sufrir una infección en el sitio de punción, y se tomarán todas las medidas necesarias para que esto no suceda.
- VIII. Se me hizo saber que en caso de sufrir daños directamente relacionados a la toma de muestra y los procedimientos de la investigación, se me dará el tratamiento médico adecuado y tendré derecho a una indemnización.
- IX. Entiendo que mi información personal será resguardada confidencialmente y que se mantendrá en anonimato mi participación.
- X. Se me ha entregado una copia de este formato de consentimiento.

Con este documento, doy mi libre consentimiento informado para participar en esta investigación médica.

Nombre completo del  
paciente: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

TESTIGO 1

Nombre completo: \_\_\_\_\_

Parentesco o relación con el paciente: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

TESTIGO 2

Nombre completo: \_\_\_\_\_

Parentesco o relación con el paciente: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma Investigador Responsable: \_\_\_\_\_

**Anexo 3**

**FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Ficha de identificación					
Nombre:	Apellidos:			Fecha de Nacimiento:	
Edad:	Género:			Registro:	
	M		F		
Lugar de nacimiento:	Teléfono casa:			Teléfono celular:	

**Historia clínica.**

Antecedentes heredofamiliares:				
Glaucoma:	No		Si	
Antecedentes personales no patológicos:				
Tabaquismo:	No		Si	
Alcoholismo:	No		Si	
Otras toxicomanías:	No		Si	
Alergias:	No		Si	
Transfusiones:	No		Si	
Cirugías:	No		Si	
Traumáticos:	No		Si	
Antecedentes personales patológicos:				
DM2.	No		Si	
HAS.	No		Si	
Migraña.	No		Si	
Otros.	No		Si	
Uso de medicamentos sistémicos.	No		Si	

Antecedentes oftalmológicos:				
Ametropía:	No		Si	
Uso de corrección óptica:	No		Si	
Uso de colirios:	No		Si	
Diagnósticos previos:	No		Si	
Procedimientos quirúrgicos o láser:	No		Si	
Diagnósticos oftalmológicos previos:	No		Si	
Interrogatorio oftalmológico dirigido:				
Baja visual:	No		Si	
Percepción de disminución del campo visual.	No		Si	
Dolor ocular:	No		Si	
Otros:	No		Si	
En caso de otros síntomas, cuáles:				



Ficha de identificación		
Nombre:	Apellidos:	Registro:

**Exploración oftalmológica.**

Ojo derecho				Ojo izquierdo				
Si		No		Capacidad visual mejor 20/40	Si		No	
				Refracción				
				Queratometrías				
Normal		Anormal		Posición primaria de la mirada.	Normal		Anormal	
Normal		Anormal		Versiones y ducciones.	Normal		Anormal	
Normal		Anormal		Párpados y anexos.	Normal		Anormal	
Biomicroscopía de segmento anterior.								
Si		No		Película lagrimal normal.	Si		No	
Si		No		Conjuntiva clara, normal.	Si		No	
Si		No		Córnea transparente.	Si		No	
Si		No		Cámara anterior amplia.	Si		No	
Si		No		Iris regular, sin hallazgos.	Si		No	
Si		No		Pupila redonda, central.	Si		No	
Si		No		Cristalino transparente.	Si		No	
Gonioscopía.								
I		II		III		IV		
				Clasificación Shaffer.	I		II	
				Otras características del ángulo.	III		IV	

Fondo de ojo								
Ojo derecho				Ojo izquierdo				
Características de la papila								
Redonda		Oblicua		Forma.	Redonda		Oblicua	
Si		No		Color naranja	Si		No	
Si		No		Palidez.	Si		No	
				Excavación en décimos. (Relación copa-disco)				
Si		No		Emergencia de vasos central.	Si		No	
				Anillo neuroretiniano.				
Si		No		Muecas.	Si		No	
Si		No		Lámina cribosa visible.	Si		No	
Si		No		Atrofia peripapilar presente.	Si		No	
Si		No		Hemorragias en astilla.	Si		No	
Si		No		Asimetría entre ojos.	Si		No	
Retina								
Si		No		Área macular normal.	Si		No	
Si		No		Periferia normal.	Si		No	

Ojo derecho.	Paquimetrías	Ojo izquierdo.
	Grosor corneal en micras.	

Ojo derecho.	Presión intraocular.	Ojo izquierdo.
	mmHg.	

**Estudios complementarios.**

Tomografía de coherencia óptica.		
Ojo derecho.		Ojo izquierdo.
	Área de disco.	
Grosor capa de fibras nerviosas.		
	General.	
	Temporal superior.	
	Temporal.	
	Temporal inferior.	
	Nasal inferior.	
	Nasal.	
	Nasal superior.	

Campos visuales SITA estándar 24-2.					
Ojo derecho.				Ojo izquierdo.	
Índices de confiabilidad.					
Falsos positivos	Falsos negativos	Pérdidas de fijación	Falsos positivos	Falsos negativos	Pérdidas de fijación
Desviación media.					
Desviación estándar del modelo.					
Descripción de hallazgos.					