



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ,
I.A.P.

“EXPRESIÓN DE NRF2 Y GFAP EN PACIENTES CON CATARATA”

TESIS

Para obtener el título de:
Cirujano Oftalmólogo

P R E S E N T A

Dra. Astrid Lucero Espinosa Soto

ASESOR DE TESIS

Dra. Liliana Cristal Salinas Cerrillo

Facultad de Medicina



Ciudad de México, Febrero 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DR. ALEJANDRO BABAYAN SOSA
PROFESOR TITULAR ANTE LA UNAM

DR. ÓRSCAR BACA LOZADA
PROFESOR ADJUNTO

DRA. ADRIANA SACUEDO CASTILLO
PROFESOR ADJUNTO/JEFE DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACIÓN

DR. JAIME LOZAN ALCÁZAR
DIRECTOR MÉDICO

DRA. LILIANA CRISTAL SALINAS CERRILLO
ASESOR DE TESIS

DRA. SELMA AIN SOMILLEDA VENTURA
ASEOSOR DE TESIS

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
CITERIOS DE INCLUSIÓN.....	15
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	15
ANÁLISIS	17
VARIABLES.....	18
RECURSOS FINANCIEROS Y FACTIBILIDAD.....	19
BIOSEGURIDAD.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27
ANEXOS.....	29

RESUMEN

Introducción: La diabetes mellitus produce un acúmulo de estrés oxidativo que lleva a una desregulación en las vías de señalización celular con una pérdida de homeostasis por lesión a proteínas, lípidos, ADN y ARN. Por ello, el paciente diabético tiene 25 veces más riesgo para el desarrollo de catarata comparado con la población general. El NRF2 en el cristalino se encarga de la estabilización de ROS con la síntesis de enzimas antioxidantes, dichos mecanismos se han encontrado alterados en estados de hiperglicemia ya que por distintas vías se desmetila su factor inhibitorio (KEAP1). El GSH es el principal protector de las proteínas cristalinas contra ROS y su expresión está inducida por NRF2. Cuando el GSH disminuye se produce la pérdida de función chaperona de las α -cristalinas, acúmulo de agregados proteicos, activación de caspasas, desequilibrio entre la cantidad de proteínas solubles e insolubles en el cristalino y pérdida de la estructura celular normal. Dicha estructura está conformada por filamentos intermedios, principalmente por GFAP que ante la elevación de ROS provoca un desequilibrio en la función de los canales iónicos, del factor de crecimiento y en la expresión de genes inflamatorios. Sólo el NRF2 se ha estudiado en los mecanismos de daño por estrés oxidativo en ojos de pacientes diabéticos. El GFAP se ha relacionado con la actividad de las células gliales y el estímulo de VEGF en retinopatía diabética. Se ha encontrado una diferencia entre los niveles séricos de NRF2 y GFAP en pacientes con diabetes mellitus en comparación con personas sanas, sin embargo, no se ha establecido si esto sucede a nivel del humor acuoso, así como su rol en el desarrollo de la catarata. Conocer la expresión de estas proteínas ampliará el conocimiento que tenemos sobre el microambiente oxidativo al que está expuesto el cristalino, siendo útil para métodos diagnósticos, pronósticos y de tratamiento futuros.

Objetivo: Cuantificar la concentración de NRF2 y GFAP a partir de muestras obtenidas de suero y humor acuoso obtenido de pacientes con cataratas y diabetes mellitus tipo 2.

Material y Métodos: Se calculó una muestra con nivel de confianza de 95% y margen error de 5%. Se realizó un estudio transversal, prospectivo, observacional, comparativo y analítico. Se incluyeron pacientes operados de cirugía de catarata en el Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz en el periodo de agosto 2020 – enero 2021. Se recolectaron muestras de plasma y humor acuoso en el día quirúrgico. Las muestras se analizaron con kit ELISA NRF2 y GFAP humano Invitrogen el cual permite conocer la concentración de

ambas proteínas comparándolas con una curva estandarizada. Para la distribución de normalidad se utilizó la prueba de Kolmogorov Smirnov y el análisis estadístico se realizó con el test de Mann Whitney y Chi cuadrada.

Resultados: Se incluyeron 80 pacientes con edad promedio de 66 años, los cuales fueron asignados a dos grupos: uno de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (n=44) y otro grupo de referencia pareado por edad (n=36). La concentración de NRF2 en humor acuoso fue mayor en el grupo de casos (177ng/dl) comparado con el de referencia (162ng/ml) (p=0.254). La concentración de GFAP en humor acuoso fue mayor en el grupo de referencia (82ng/ml) comparado con el de casos (55ng/dl) (p=0.588). En suero no hubo diferencia entre grupos para NRF2 (p>0.99) ni para GFAP (p>0.92).

Conclusiones: No se encontró que tuvieran una concentración significativamente distinta en humor acuoso de pacientes con diabetes comparado con el grupo de referencia, por lo que deben existir otros mecanismos que pueden aumentar o inhibir su expresión de manera independiente.

INTRODUCCIÓN

Estrés oxidativo

El ojo es un órgano que se encuentra en constante exposición al estrés oxidativo, ya sea por la radiación ultravioleta, la radiación ionizante, la dieta o el tabaquismo¹, lo anterior se ha vinculado con el desarrollo de distintas patologías oculares, como las cataratas.² El daño por estrés oxidativo provoca una combinación de factores que inducen la cataratogénesis, entre ellos: la disfunción de las fibras cristalinas³, el aumento en la permeabilidad de la membrana epitelial, mecanismos inflamatorios,⁴ altos niveles de glucosilación no enzimática y una pérdida de los mecanismos antioxidantes.³

La oxidación es un proceso bioquímico donde existe una constante reducción de electrones de oxígeno dentro de la mitocondria provenientes del metabolismo aeróbico. De la reducción parcial de electrones se obtienen superóxidos y especies reactivas de oxígeno (ROS).¹

Específicamente el estado de hiperglicemia de pacientes diabéticos satura el ciclo de Krebs con lo que se inhibe la transferencia de electrones en la membrana de la mitocondria con acumulación de radicales libres en consecuencia. Al aumentar las ROS se activa la vía de los polioles, de la hexosamina y la proteína cinasa C (PKC), así como la formación de productos finales de glicosilación avanzada² que en conjunto propician la acumulación de más radicales libres.

En condiciones fisiológicas, la producción controlada de factores oxidantes regula las vías de señalización intracelular y contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular.⁵ Por otro lado, al ser moléculas de vida corta y altamente reactivas, al acumularse ocasionan desnaturalización de proteínas, oxidación de

membranas lipídicas, pérdida de la homeostasis del calcio y fragmentación de ADN y ARN.⁶

El estrés oxidativo es un término empleado desde hace 15 años para definir la falla en el equilibrio que mantiene el organismo entre la producción de ROS y la síntesis de moléculas antioxidantes que buscan contrarrestar el daño celular y la activación de vías inflamatorias que conducen hacia la muerte celular.²

Las vías antioxidantes celulares se pueden clasificar en tres sistemas de reacción de fases consecutivas (fase I, II y III). Los sistemas de reacción de fase I involucran las reacciones de reducción-oxidación (REDOX) llevadas a cabo en el sistema enzimático del citocromo P450, los productos de esta reacción posteriormente se conjugan con otras moléculas, como el glutatión (GSH), en reacciones de fase 2. Las moléculas que catalizan las reacciones de fase 2 se pueden clasificar como antioxidantes de acción directa o indirecta; dentro de los de acción directa se incluyen la superóxido dismutasa (SOD1) y el glutatión, estos antioxidantes actúan secuestrando ROS. Los antioxidantes indirectos sintetizan y reciclan moléculas como GSH y tioredoxina (Trx).⁷ Finalmente, las moléculas del sistema de fase III transportan y eliminan los metabolitos finales de las reacciones previas hacia el espacio extracelular. Las enzimas involucradas en estas vías tienen acciones coordinadas que se superponen para la protección de proteínas, lípidos y ADN susceptibles a daño por estrés oxidativo.⁸

La función de las enzimas de fase II está controlada por el factor de transcripción eritroide nuclear tipo 2 (NRF2), la proteína Kelch derivada de eritroide, la proteína ECH1 asociada (Keap 1) y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK).⁶

Factor eritroide nuclear tipo 2

El factor de transcripción NRF2 está localizado en el cromosoma 2q31⁹ y se expresa en diversos tejidos del organismo, tales como músculo, pulmón¹⁰ y cristalino. Es un citoprotector clave contra el estrés oxidativo asociado a radicales libres.¹¹ Además de sus funciones antioxidantes y antiinflamatorias que favorecen la supervivencia y proliferación celular, regula la expresión de diversos genes involucrados en la remodelación de tejidos y fibrosis, así como la restricción calórica celular. Este factor de transcripción participa también en el metabolismo de lípidos y regula la actividad de la insulina.⁶

Normalmente, ante la ausencia de ROS, el NRF2 se encuentra inactivo en el citoplasma unido a la proteína Keap 1, la cual funciona como un sensor de estrés oxidativo. La unión de Keap 1 con NRF2, promueve la ubiquitinización y degradación proteosómica de la subunidad 26 de NRF2 para mantenerlo en cifras basales inhibitorias.⁶ Otros inhibidores de NRF2 son el selenio, la homocisteína y el ácido valproico.

La activación de NRF2 depende de diferentes estímulos como la radiación UVA¹², la hipoxia, los estímulos xenobióticos, la inflamación, la oxidación y el estrés en el retículo endoplásmico (RE); la duración de su actividad corresponde con la presencia del estímulo.¹³ Existen otros factores exógenos como los polifenoles, los flavonoides y terpenos que también inducen su activación y son compuestos clave para la protección ocular contra el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis.¹⁴

Ante la presencia de cualquiera de estos factores Keap 1 sufre un cambio residual en su aminoácido lisina, liberando así a NRF2 y permitiendo su movilización hacia el núcleo de la célula, este movimiento se encuentra mediado por la PKC. Una vez en el núcleo, NRF2 interactúa con la región promotora del

elemento de respuesta antioxidante (ARE) y lo fosforila para que presente un cambio conformacional e inicie la transcripción de diversos genes que regulan, mediante la vía de las MAPK, la PKC y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la expresión de enzimas antioxidantes, enzimas que detoxifican xenobióticos, chaperonas moleculares, enzimas de reparación del ADN, y proteínas de respuesta antiinflamatoria; cabe destacar que la activación de la PI3K, es un componente importante en vías de señalización de insulina.^{15,9}

Algunas de las enzimas expresadas por la activación de NRF2, son las del sistema antioxidante del glutatión, como la glutatión S-transferasa (GST), glutamato-cisteína ligasa (GCL), glutatión reductasa (GR), y glutatión peroxidasa, así como también las del sistema tiorredoxina y otras enzimas involucradas en la regeneración de NADPH. Estos grupos de enzimáticos inhiben el daño estructural y funcional mediante diferentes mecanismos, como el secuestro de catalizadores de óxido de metales de transición, agentes quelantes, regulación de la actividad enzimática, barrido de radicales libres de reacciones en cadena, regeneración de otros antioxidantes, etc.¹

En los últimos años, se han descubierto nuevas funciones de NRF2, las cuales van más allá de su regulación antioxidante. Entre estas funciones, se encuentran la regulación de la función mitocondrial en los fibroblastos (producción e ATP y respiración), eliminación de proteínas anormales y regulación de células madre hematopoyéticas, entre otras.⁷

Expresión de NRF2 en el cristalino

Es bien conocido el papel del desequilibrio entre factores oxidantes y antioxidantes en el cristalino y la formación de catarata. Dentro de los antioxidantes más importantes en el cristalino, se encuentra el glutatión reducido

(GSH) el cual es un tripéptido que se une a los radicales libres, cuya síntesis está controlada por las enzimas antioxidantes dependientes de NRF2.

Cuando los niveles de glutatión disminuyen, diversos mecanismos llevan a la opacificación del cristalino, entre ellos la oxidación de proteínas cristalinas (α , β y γ cristalinas), la generación y acúmulo de agregados proteicos, la pérdida de función chaperona de las α -cristalinas, con pérdida de la estructura celular normal, el incremento en la peroxidación lipídica y el desequilibrio entre la cantidad de proteínas solubles e insolubles en el cristalino.¹

Existen otras vías que se activan ante el incremento en el estrés oxidativo, como la activación de la vía de las caspasas, las cuales también contribuyen también a la formación de cataratas.⁶

Se ha observado que algunas modificaciones epigenéticas y polimorfismos en los genes de NRF2 y Keap 1 pueden acelerar el desarrollo de cataratas, especialmente en pacientes sometidos a mayor cantidad de estrés oxidativo como aquellos con Alzheimer¹²; la expresión de NRF2 en el epitelio cristalino de pacientes mayores de 65 años disminuye mientras que la expresión de Keap 1 se encuentra aumentada, esto como consecuencia de una desmetilación que ocurre secundaria a concentraciones excesivas de ROS, llevando a un aumento en la transcripción de Keap 1 y niveles bajos de proteínas antioxidantes.¹⁶

En publicaciones recientes, se han estudiado otras moléculas como el metilglioxal (MGO), dentro de la supresión de la actividad de NRF2. Debido a que el cristalino se encuentra en un ambiente con poco oxígeno, la generación de MGO a partir de la hiperglicemia se favorece. El MGO aumenta la producción de ROS, generando estrés oxidativo en el RE, posteriormente se activan los mecanismos de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), éstas alteran la homeostasis del calcio al liberarlo del RE y activan una vía enzimática alterna que se encarga también de la desmetilación de Keap1.²

Por lo tanto, el estímulo en la vía de señalización de NRF2 se ha propuesto como una terapia blanco para la protección celular, la prevención de complicaciones macro y microcelulares por diabetes así como la prevención de cataratas.⁹

Los filamentos intermedios del cristalino

Las ROS se han identificado en distintas estructuras oculares, por ejemplo en el humor acuoso que se encuentra en contacto con el endotelio corneal, la malla trabecular y el cristalino.¹² A pesar que estas estructuras tienen un origen embriológico distinto, comparten características en común ya que son tejidos avasculares y su nutrición depende del humor acuoso, cuando éste sufre cambios en sus composición se producen alteraciones en dichas estructuras como consecuencia.¹⁴

En el epitelio del cristalino se mantienen altas concentraciones de GSH para evitar que las ROS dañen a las proteínas del grupo sulfhidrilo (NA/K-ATPasa, proteínas del citoesqueleto y proteínas de transporte de membrana), las cuales son claves para su funcionamiento¹⁸; cualquier cambio en la relación intercelular lleva a alteraciones en la difracción, absorción y reflexión de la luz, lo que altera la calidad de la visión.¹⁹

El citoesqueleto está formado por tres sistemas de filamentos: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios. Los filamentos intermedios son el componente más dinámico, están constituidos por varias proteínas y se denominan intermedios ya que su diámetro es aproximadamente de 8 a 15 nm.²⁰ Sus funciones van desde participar en el proceso de señalización celular hasta proporcionan un andamio a las chaperonas, al proteosoma y a las cinasas de estrés para la reparación de proteínas dañadas y eliminan las que no pueden restaurarse para evitar la activación de las vías de señalización por estrés.¹⁹

En los humanos hay 70 genes diferentes que codifican para las distintas subunidades que forman los filamentos, y estos últimos se clasifican en 6 grupos principales. El grupo III se subdivide a su vez en 4 grupos: vimentinas, desminas, proteína fibrilar ácida y periferina.²¹

La proteína glial fibrilar ácida

La proteína glial fibrilar ácida (GFAP) está presente principalmente en los astrocitos en células endoteliales del sistema nervioso central y en menor medida en las células de Müller y en el epitelio cristalino.

Puede expresarse en 10 isoformas distintas, formando filamentos de 10 nm bajo un pH de 7, tiene un peso molecular de 50 KDa y se compone de tres regiones: cabeza, barra y cola, compuestas por un total de 430 aminoácidos.²²

Los filamentos intermedios sufren cambios estructurales todo el tiempo, se conoce que existe una fosforilación y desfosforilación constante en la región de la cabeza de las GFAP lo que las lleva de un estado soluble a insoluble.

Se han desarrollado distintos anticuerpos para reconocer a las GFAP en estados de fosforilación, las cuales coinciden con fases mitóticas²² en respuesta a daño celular por lo que se emplean como marcadores de proliferación de astrocitos y neoplasias del sistema nervioso central. El aumento de GFAP también se ha observado en Alzheimer, leucodistrofias y esclerosis múltiple.²⁰

La respuesta glial de los astrocitos ante el daño es similar a la presentada por las células de Müller en condiciones patológicas²³, se conoce como gliosis, funciona como un sensor de estrés ocular²⁴ y dicho proceso conlleva a la hipertrofia y proliferación celular y a un aumento de las proteínas de los filamentos intermedios como la nestina, vimentina y GFAP.²⁵

Por otro lado, la expresión de GFAP se afecta secundariamente por varios mecanismos, entre ellos por diabetes, provocando alteraciones en la señalización de neurotransmisores, en la función de los canales iónicos, así como alteraciones en el factor de crecimiento y la expresión de genes inflamatorios.²⁶

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés oxidativo es un factor esencial dentro de la fisiopatología de la catarata, sobretodo en pacientes con diabetes mellitus ya que propicia el acúmulo de radicales libres. Hasta ahora no está establecida la relación que guardan las proteínas NRF2 y GFAP dentro del microambiente que rodea al cristalino cuando éste se encuentra sometido a estrés oxidativo.

JUSTIFICACIÓN

El estado de hiperglicemia crónica en conjunto con otras vías, producen la acumulación de radicales libres, que inhiben el NRF2 favoreciendo el daño por estrés oxidativo y en consecuencia a la formación de cataratas. Por otro lado, la GFAP responde al estrés oxidativo con gliosis provocada por la estimulación proteica lo que lleva a una proliferación celular y desorganización de la arquitectura del citoesqueleto que afecta la transparencia del cristalino.

El estudio de las proteínas NRF2 y GFAP pueden ayudar a comprender si su relación y expresión favorecen o retrasan la cataratogénesis y en un futuro ser de utilidad para la prevención y el tratamiento de las cataratas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la expresión de las proteínas NRF2 y GFAP en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con cataratas?

HIPÓTESIS

La expresión de NRF2 y GFAP es diferente en los pacientes sanos que desarrollan cataratas en comparación con los pacientes con diabetes mellitus que desarrollan cataratas.

OBJETIVO GENERAL

- Cuantificar la concentración de NRF2 y GFAP a partir de muestras obtenidas de suero y humor acuoso de pacientes sanos y pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con cataratas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la correlación de la expresión de NRF2 en el desarrollo de catarata en suero.
- Determinar la correlación de la expresión de NRF2 en el desarrollo de catarata en humor acuoso.
- Determinar la correlación de la expresión de GFAP en el desarrollo de cataratas en suero.
- Determinar la correlación de la expresión de GFAP en el desarrollo de cataratas en humor acuoso.
- Determinar si la expresión de NRF2 ofrece un efecto protector para el desarrollo de cataratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal, prospectivo, observacional, analítico y comparativo, los pacientes se captaron a partir de la programación quirúrgica de facoemulsificación de una población mexicana del Departamento de Microcirugía del Segmento Anterior del Hospital Fundación Nuestra Señora de la Luz I.A.P., en un periodo comprendido de Abril 2020 a Enero del 2022.

Tamaño de muestra

Se realizó un cálculo del tamaño de muestra de comparación de promedios con un nivel de confianza del 95%, una potencia del 80%, un porcentaje de pérdidas de 20%. Se consideró una varianza 6.38 para el grupo de referencia pareado por edad y una varianza de 6.86 para el grupo de pacientes con diabetes, basadas en el protocolo de Vujosevic²⁴ sobre la concentración de GFAP en humor acuoso de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ya que actualmente no se han encontrado estudios donde se estudien ambas proteínas (NRF2 y GFAP) en humor acuoso. La diferencia entre estos grupos se estableció de 2 picogramos.

El tamaño de muestra calculado es de 31 pacientes utilizando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 * (S_1^2 + S_2^2)}{(X_1 - X_2)^2}$$

Selección de pacientes

Los pacientes se dividieron en dos grupos, los casos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud) y el de referencia pareado por edad. Los criterios de exclusión fueron diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1, presencia de retinopatía diabética proliferativa, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo Alzheimer, Parkinson, etc.), el uso de medicamentos antiepilépticos como el ácido valproico, multivitamínicos que contengan selenio y el uso concomitante de esteroides sistémicos y tópicos.

Se aprobó el estudio por el Comité de Ética e Investigación con clave de protocolo 2020058R2. Los consentimientos informados de cada paciente están incluidos en el protocolo de acuerdo a los términos establecidos en la Declaración de Helsinki para el manejo de tejidos biológicos.

Todos los sujetos en estudio firmaron el consentimiento informado acerca de los alcances del estudio y la autorización para usar los datos obtenidos en presentaciones y publicaciones científicas, manteniendo el anonimato de los participantes.

La base de datos de los pacientes se concentró en programa Microsoft Excel.

Toma de muestras

El plasma se obtuvo de muestras de sangre por punción de vena periférica el día de la cirugía durante la canalización del paciente en hospitalización, se almacenaron un tubo rojo para centrifugarse. Todas rotuladas con el nombre del paciente, expediente clínico y fecha de nacimiento

La toma de muestra de humor acuoso se realizó en quirófano previo a comenzar la cirugía de catarata. El procedimiento fue con asepsia y antisepsia, anestesia tópica y blefaróstato, el paciente en decúbito supino, bajo microscopía se realizó paracentesis de la cámara anterior en el limbo temporal, con una jeringa de insulina de 30 Gauge con el bisel de la aguja apuntando hacia arriba y con la aguja paralela al plano del iris, manteniendo la punta de la aguja sobre la periferia media del iris evitando tocar el cristalino. Se obtuvieron 150-200 microlitros de humor acuoso. La muestra se colocó en un tubo de microcentrifugación Eppendorf previamente rotulado con el nombre del paciente, su fecha de nacimiento, así como número de expediente.

Las muestras de sangre se refrigeraron a 2-8° C por 2 horas y después de centrifugarlas se almacenaron a -80°C.

Análisis de muestras

El ELISA tipo sándwich es un estudio que se basa en una micro-placa con anticuerpos de captura a la cual se agregan las muestras tomadas de los pacientes con los antígenos de interés que en este caso son las proteínas NRF2 y GFAP. Posteriormente, se agregan anticuerpos de detección biotinilados y conjugados enzimáticos de estreptavidina para incubarse. Se lava y se agrega una solución con sustrato a cada pozo y aquellos que reaccionen con la enzima emitirán una señal visible cuya intensidad se mide por espectrofotometría. Para calcular la concentración de proteínas, se comparan la intensidad de las señales obtenidas con la curva estándar de la prueba.

La siguiente tabla resume las características del manejo de muestras de cada prueba:

Kit ELISA	NRF2	GFAP
Almacenamiento	2-8°C si se procesa dentro de los 30 minutos de la toma de muestra o de -20 a -80°C si se procesará posteriormente	2-8°C
Sensibilidad	0.1ng/mL	0.19ng/mL
Especificidad	No tiene reacciones cruzadas que interfieran con la detección	No tiene reacciones cruzadas que interfieran con la detección
Manejo de muestra de plasma	Centrifugar por 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto el mismo día	Centrifugar por 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto el mismo día, Prueba no útil si la muestra es hemolisada.
Manejo de humor acuoso	Refrigerar a -80°	Refrigerar a -80°

Para la distribución de normalidad se utilizó Kolmogorov Smirnov y el análisis estadístico se hizo con test de Mann Whitney y Chi cuadrada.

Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA / UNIDAD DE MEDICIÓN
Edad	Tiempo de vida de una persona	Años de vida hasta el momento del estudio	Secundaria	Cuantitativa discreta
Expresión de NRF2	Factor eritroide nuclear tipo 2	Factor de transcripción encargado de la activación génica para la síntesis de enzimas antioxidantes, factores antiinflamatorios se encarga de la restricción calórica celular, el metabolismo de lípidos y la actividad de la insulina.	Dependiente	Cuantitativa continua
Expresión de GFAP	Proteína glial fibrilar ácida	Proteína de filamento intermedio del grupo III componente del citoesqueleto relacionado con células gliales.	Dependiente	Cuantitativa continua
Diabetes Mellitus tipo 2	Enfermedad crónica, metabólica, que consiste en una actividad deficiente de la insulina resultando en estados de hiperglicemia sérica elevados.	Se registra en los antecedentes personales patológicos del paciente si cuenta con diagnóstico de diabetes mellitus.	Independiente Cualitativa	Cualitativa nominal dicotómica: <ul style="list-style-type: none"> • Sí • No
Comorbilidad	Enfermedades crónicas, además de diabetes melitus, que padezca el paciente y se han relacionado con alteraciones relacionadas con NRF2 y GFAP	Se registran los antecedentes personales patológicos del paciente	Secundaria	Cualitativa nominal politómica: <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad neurodegenerativa • Enfermedad reumática • Enfermedad hepática • Enfermedad pulmonar • VIH • Cáncer • Enfermedad cardiaca • Enfermedad renal

Cronograma de actividades (anexo 1)

RECURSOS FINANCIEROS Y DE FACTIBILIDAD

Se requiere de una población de pacientes con catarata y diagnóstico concomitante de diabetes mellitus tipo 2. Siendo el Hospital Fundación Nuestra Señora de la Luz un centro de referencia donde se concentran un gran número de casos como el del tema a investigar, se vuelve factible encontrar una población con los diagnósticos antes mencionados. De acuerdo con la programación revisada del Departamento de Microcirugía del Segmento Anterior del Ojo, se realizan diariamente un promedio de 22 cirugías de facoemulsificación y del total de pacientes programados durante el turno matutino y vespertino. El Hospital puede garantizar el empleo de quirófanos con material completo, así el de corriente y planta eléctrica que permita el uso continuo del equipo de facoemulsificación, a la vez de contar con médicos de alta especialidad capacitados para el empleo de dicha técnica quirúrgica.

Se requiere de 31 tubos rojos y 31 morados con EDTA para la toma de muestras de sangre, así como 31 agujas de insulina y tubos de microcentrifugado Eppendorf para las muestras de humor acuoso.

Para el análisis de las muestras de emplearán los Kits ELISA de NRF2 y GFAP humanos. Cada microplaca de ELISA puede contener hasta 96 pozos. El Kit ELISA para GFAP humano para 24 tiras tiene un costo de \$190 USD. El Kit ELISA para NRF2 humano para 48 tiras tiene un costo de \$440 USD. De acuerdo al tamaño de muestra se solicitará la cotización conveniente para el número de tiras.

BIOSEGURIDAD

Se trata de un estudio que representa un riesgo mínimo para el paciente cumpliendo criterios que garantizan la observancia de las normas universales de bioseguridad y se complementa siguiendo las diferentes normas oficiales

mexicanas en la materia, las cuales se mencionan a continuación: la Ley General de Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la NOM-178-SSA1-1998. Requisitos mínimos de infraestructura y equipamiento de establecimientos para la atención médica de pacientes ambulatorios y la NOM-003-SSA2-1993. Para la disposición de sangre humana y sus componentes.

Se cuenta con un laboratorio con nivel de bioseguridad 2 destinado a diagnóstico, investigación y análisis clínico donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado que se encuentran presentes.

Carta de consentimiento informado (Anexo 2)

RESULTADOS

Se obtuvo una muestra de 112 pacientes, de los cuales 32 se excluyeron por presentar una toma de muestra incompleta. Se incluyeron 80 pacientes, de los cuales 56.25% (n=45) fueron mujeres y 43.75% (n=35) fueron hombres (p=0.909). El 96.25% (n=77) fueron operados de cirugía de facoemulsificación y el 3.75% (n=3) de cirugía de extracción extracapsular de catarata (p=678).

De todos los pacientes que cumplieron criterios de inclusión, 36 fueron asignados al grupo de referencia pareado por edad y 44 al grupo de casos, la distribución demográfica de los grupos está representada en la Tabla 1.

	Grupo referencia n=44	Grupo casos n=36	Valor de p
Sexo (H:M)	16:20	19:25	0.909
Edad (SD)	67 ±9.94	65±8.46	0.333
Ojo (D:I)	19:17	19:25	0.392
HAS	12	26	0.021

Tabla 1. Distribución demográfica de los pacientes incluidos. H: hombre, M: mujer. SD: desviación estándar. D: ojo derecho, I: ojo izquierdo. HAS: hipertensión arterial sistémica.

En total 38 pacientes tenían diagnóstico de hipertensión arterial sistémica, cuya distribución de tratamientos se muestra en la Tabla 2.

De los pacientes con medicamentos combinados, 4 usaban betabloqueador con ARA2; 2 usaban diurético con IECA y otros 2 diurético con ARA2; 3 bloqueadores de canales de calcio con betabloqueador y 2 bloqueadores de canales de calcio con ARA 2; 1 paciente utilizaba betabloqueador con bloqueador de canales de calcio y ARA2.

Se encontró un promedio de glicemia en ayuno para el grupo de casos de 130 mg/dl \pm 48.11 y para el grupo de referencia de 100 mg/dl \pm 12.09 (p<0.0001).

El tratamiento para diabetes mellitus tipo 2 del grupo de casos se encuentra en la Tabla 3. De los pacientes en tratamiento con hipoglicemiantes orales, 34 usaban metformina, como monoterapia o combinada con insulina u otro hipoglicemiante oral como acarbosa, glibenclamida o linagliptina. Sólo 2 pacientes usaban otro hipoglicemiante diferente a metformina como vidagliptina y acarbosa.

Tratamiento	Grupo referencia	Grupo casos
IECAS	1(1.3%)	6 (8.8)
ARA2	3 (3.8%)	10(12.5%)
Betabloqueador	0(0%)	1(1.3%)
Bloqueadores Ca	1(1.3%)	2(2.5%)
Combinado	7(8.8%)	7(8.8%)
Ninguno	24(30%)	18(21.3%)
Total	36(45%)	44(55%)

Tabla 2. Tipo de tratamiento para hipertensión arterial sistémica entre grupo de casos y grupo pareado por edad. IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina. ARA2: antagonista del receptor de angiotensina II. (p=0.072)

Tratamiento	Grupo casos
Insulina	5(6.3%)
Insulina + oral	9 (11.3%)
Metformina	14 (17.5%)
Combinado oral	10(12.5%)
Otros	2(2.5%)
Sin tratamiento	24(30%)
Total	4(5%)

Tabla 3. Tipo de tratamiento para diabetes mellitus tipo 2 en el grupo de casos.

La mediana de NRF2 en humor acuoso para el grupo de referencia fue de 162ng/ml y para el grupo de casos fue de 177ng/dl ($p=0.254$). La mediana de GFAP en humor acuoso para el grupo de referencia fue de 82ng/ml y para el grupo de casos fue de 55ng/dl ($p=0.588$). En cuanto a la comparación de concentración de NRF2 y GFAP en suero no hubo diferencia significativa entre grupos ($p=0.997$ y $p=0.921$ respectivamente).

DISCUSIÓN

En este estudio se presenta la relación entre la expresión de NRF2 y GFAP en pacientes con catarata y diabetes mellitus. No se encontró diferencia entre la concentración de estas proteínas en humor acuoso y suero entre pacientes con diabetes y el grupo de referencia.

La síntesis de enzimas antioxidantes a partir de la activación de genes citoprotectores por medio del factor de transcripción NRF2 se ha confirmado como una línea clave para la protección contra el daño celular, sin embargo, la inducción de su expresión depende de otras vías subcelulares, muchas de las cuales aún no se han elucidado y que aparentemente son muy variables según el tejido estudiado.²⁷

El NRF2 tiene un tiempo de vida promedio menor a 20 minutos en distintas líneas celulares², y su concentración dentro del cristalino es baja.⁶ Esto lo hace una proteína difícil de detectar y cuantificar. Lo que podría explicar las concentraciones negativas cercanas a cero encontradas en el suero de los pacientes incluidos en este estudio.

Su principal vía de degradación es a través de la Ligasa E3 específica para NRF2 que es dependiente de Keap1²⁸, aunque ya se han encontrado otras formas de degradación independientes a esta última.

Contrario a la mayoría de reportes, estudios más recientes encontraron que la vía de ubiquitinación del proteosoma activada por Keap1, puede evitar la degradación del NRF2.²⁹

Rowan, et al. compararon dos grupos de ratones knockout NRF2 negativo alimentados con dietas hipo e hiperglicémicas sin encontrar diferencia significativa entre la incidencia y severidad de las cataratas.³⁰ Nuestro estudio no encontró una diferencia de concentración en humor acuoso para NRF2 entre grupos, por lo que el NRF2 no representó un componente específico para el desarrollo de cataratas en pacientes diabéticos y más bien estaría involucrado con el desarrollo de opacidades del cristalino relacionadas con la edad. En este sentido, se podrían comparar por grupos de edad, las concentraciones de NRF2 y relacionarlas con la localización y severidad de la catarata para futuros estudios.

Por otro lado, sustancias endógenas como las prostaglandinas y el óxido nítrico inducen la activación del NRF2, mientras que la PKC puede modular su respuesta³¹; estos factores se encuentran en mayor concentración en pacientes diabéticos y forman un componente esencial para el desarrollo y progresión de la retinopatía diabética. En este estudio la concentración de NRF2 se encontró en mayores concentraciones en el grupo de casos comparado con el de referencia, aunque no se encontró una diferencia significativa, podrían considerarse estas

sustancias como factores que favorecieron la expresión de NRF2 en pacientes con diabetes mellitus en quienes aún no se observan datos clínicos de retinopatía diabética.

Los pacientes con diabetes mellitus además presentan daño células de la glia por isquemia y el tratamiento con insulina revierte la disminución de la expresión de proteínas por parte de los astrocitos, como la GFAP que es un filamento intermedio esencial para el citoesqueleto. Las células gliales juegan un papel importante en la homeostasis, mantienen las barreras hematológicas, regulan el pH, la transmisión sináptica, entre otras cosas.

Fernandes et al, midieron el GFAP en ratones con diabetes, encontrando una disminución en su expresión más que en el número de astrocitos³². Barber et al. explican que existe una reducción y redistribución de ocludinas en las células endoteliales, además de la disminución en la expresión de GFAP lo que altera las interacciones del endotelio con la glia favoreciendo la ruptura de la barrera hematoretiniana³³. En 2015 Vujosevic, et al encontraron concentraciones mayores de GFAP y AQP1 y 4 en pacientes diabéticos comparado con los controles²⁴. Este estudio no demostró una diferencia significativa entre los niveles de GFAP para ambos grupos, sin embargo, existe contradicción con respecto al papel de GFAP en un microambiente con hiperglicemia y los mecanismos que modulan su expresión.

Los resultados de este estudio sugieren que deben existir múltiples mecanismos para la expresión de NRF2 y GFAP en el cristalino que no dependen directamente del estrés oxidativo secundario a la diabetes mellitus.

La ausencia de diferencia entre los grupos podría deberse a que el principal factor determinante en el desarrollo de catarata fue la edad por encima de los niveles de glucosa. Habría que comparar si la concentración de estas proteínas

es distinta en pacientes sanos jóvenes y aquellos que desarrollan catarata metabólica de manera temprana.

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que relaciona la concentración de NRF2 y GFAP, a partir de muestras de humor acuoso y suero, con el desarrollo de cataratas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Muchos de los estudios moleculares en oftalmología se han estudiado en modelos animales por las limitaciones para obtener biopsias del ojo. A nivel oftalmológico, la biopsia de fluidos es accesible y segura para el diagnóstico de patologías intraoculares y el humor acuoso representa un fluido biodinámico que permite la cuantificación precisa, in vivo, de proteínas y factores que pueden establecerse como biomarcadores de enfermedades oftalmológicas en un futuro.

La dificultad para detectar NRF2 en el humor acuoso resulta un reto para los siguientes estudios. Se podrían hacer diluciones para determinar su concentración ya que nuestros resultados fueron cercanos a cero, para lo que se requiere una mayor cantidad de muestra de humor acuoso por paciente para ser analizadas por pruebas más sensibles como Western Blot.

Se encontró además que, de la población operada de cirugía de catarata, el 47% de los pacientes del grupo de referencia, presentaron cifras alteradas de glicemia en ayuno con un promedio de 124 mg/dl sin conocerse con algún antecedente patológico y 5 pacientes que pertenecían a este grupo fueron reasignados al grupo de casos por presentar cifras diagnosticas de diabetes mellitus. México es uno de los países con mayor prevalencia de enfermedades crónico-metabólicas por lo que se requieren protocolos más efectivos de tamizaje para poder realizar un diagnóstico temprano y sobretodo una prevención activa.

CONCLUSIÓN

El daño por estrés oxidativo es uno de los cambios celulares más estudiados en los últimos años y se ha reconocido como uno de los responsables principales de la cataratogénesis. Este estudio no demostró que hubiera una diferencia significativa en la expresión de GFAP y NRF2 en suero y humor acuoso de pacientes con diabetes mellitus comparado con el grupo sin diabetes, sin embargo, se requieren estudios adicionales para identificar si estas proteínas juegan algún papel en relación con el desarrollo de cataratas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ja, V. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006;13:151–162.
2. Batliwala S, Xavier C, Liu Y, Wu H. Involvement of Nrf2 in Ocular Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017;20:1–18.
3. Kaur J, Kukreja S, Kaur A, Malhotra N. The Oxidative Stress in Cataract Patients. *J Clin Diagnostic Res* 2012;6:629–1632.
4. He Q, Gao Y, Wang T, Zhou L, Zhou W. Deficiency of Yes-Associated Protein Induces Cataract in Mice. *Aging Dis* 2019;10:293–306.
5. Qiand, M. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013;53:401–426.
6. Liu X, Hao J, Xie T, Malik T, Lu C, Liu C, et al. Nrf2 as a target for prevention of age-related and diabetic cataracts by against oxidative stress. *Aging Cell* 2017;16:934–942.
7. Tonelli C, Chio C. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 2018;29:1727–1745.
8. Wang X. Ectodermal-neural cortex 1 down- regulates Nrf2 at the translational level. *PLoS One* 4 2009:492.
9. Hendrawati A. Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) as A Therapeutical Target in Type-2 Diabetes Mellitus: A Review *Indones Biomed J* 2017;9:73–77.
10. Zhao H, Eguchi S, Alam A. The role of nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) in the protection against lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016;312:155–162.
11. Danilenko M. Oxidative Phosphorylation Induces Nrf2-Driven Antioxidant Response Via ERK5/MEF2/miR-23a Signaling to Keap-1. *EBioMedicine* 2016;3:4–5.
12. Otter M, Landgren S, Nilsson S. Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes influence disease progression but not risk in Alzheimer's disease and age-related cataract. *Mech. Ageing Dev* 2010;131:105–110.
13. Zhivotovsky B. Free Radicals in Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 2013;21:86–102.
14. Wang M, Li J. The Potential Role of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) in Glaucoma: A Review. *Med Sci Monit* 2020;26:921514 1–8.
15. Hayes J. Glutathione and glutathione- dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999;31:273–300.
16. Gao Y, Yan Y. Human age-related cataracts: Epigenetic suppression of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated antioxidant system. *Mol Med Rep* 2015;11:1442–1447.
17. Palsamy P, Bidasee K, Ayaki M. Methylglyoxal induces endoplasmic reticulum stress and DNA demethylation in the Keap1 promoter of human lens epithelial cells and age-related cataracts. *Free Radic Biol Med* 2014;72:134–148.

18. Giblin, F. Glutathione: A Vital Lens Antioxidant. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000;16:121–135.
19. Song S, Landsbury A, Dahm R, Liu Y, Zhang Q. Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *J Clin Invest* 2009;119:1837–1848.
20. Lupien C, Brenner M, Guerinc S. Expression of glial fibrillary acidic protein in primary cultures of human Müller cells. *Exp Eye Res* 2004;79:423–429.
21. Etienne M. Cytoplasmic intermediate filaments in cell biology. *Annual review of cell and developmental biology* 2018;34:1–28.
22. Inagakil M, Nakamuraz Y, Inagaki M, Tsuyoshi N. Glial Fibrillary Acidic Protein: Dynamic Property and Regulation by Phosphorylation. *Brain Pathol* 1994;4:239–243.
23. Sarthy V. Focus on Molecules: Glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Exp Eye Res* 2017;84:381–382.
24. Vujosevic S, Micera A, Bini S, Berton M, Esposito G. Aqueous Humor Biomarkers of Müller Cell Activation in Diabetic Eyes. *IOVS* 2015;56: 3913–3918.
25. Hatfield J, Skoff R, Maisel H. Glial Fibrillary Acidic Protein is Localized in the Lens Epithelium. *J Cell Biol* 1984;98:1895–1898.
26. Ly A, Yee P, Vessey K, Phipps J, Jobling A. Early Inner Retinal Astrocyte Dysfunction during Diabetes and Development of Hypoxia, Retinal Stress, and Neuronal Functional Loss. *IOVS* 2011;52:9316–9326.
27. Kwak M, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler T. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 2003;278:8135–45.
28. Zhang D, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2003;23:8137–51.
29. Sekhar K, Yan X, Freeman M.. Nf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by KIAA0132, the human homolog to INrf2. *Oncogene* 2002;21:6829–34.
30. Rowan S, Jiang S, FitzGerald P, Mahaling B, Duh E, Taylor A. Age-related cataracts in mice lacking the Nrf2 antioxidant transcription factor. *ARVO Annual Meeting Abstract*. 2020: 61:1028.
31. Konigsberg M. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Div Ciencias Biol y de Salud* 2007;26:18-25.
32. Fernandes E, Monteiro M, Viani F. Decreased astrocytic GFAP expression in streptozotocin induced diabetes after gliotoxic lesión in the rat brainstem. *Arq Bras Endocrinol Metab*;2013;57:431-435.
33. Barber A, Antonetti D, Gardner T. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. *IOVS* 2000;41:3561-3568.

ANEXO 1

<i>Datos del paciente</i>	Nombre: Fecha de nacimiento:
<i>Expediente clínico No.</i>	
<i>Médico informante (investigador principal):</i>	Firma:
<i>Diagnóstico</i>	

Datos de la investigación

<i>Nombre del protocolo</i>	EXPRESIÓN DE GFAP Y NRF2 EN PACIENTES CON CATARATA
<i>Investigadores</i>	Dra. Liliana Cristal Salinas Cerrillo Dra. Astrid Lucero Espinosa Soto Dra. Selma Aline Somilleda Ventura
<i>Justificación y objetivos</i>	En esta institución se desarrollan investigaciones que forman parte de nuestro quehacer científico. El propósito de este estudio es conocer la concentración de las proteínas NRF2 y GFAP en plasma y humor acuoso de pacientes con catarata. Sobre todo en aquellos que además cuentan con diagnóstico de diabetes mellitus comparándolos con pacientes sanos. Esta investigación aporta nueva información sobre la relación de la concentración de estas proteínas y la precipitación del desarrollo de cataratas secundario al estrés oxidativo en pacientes diabéticos mexicanos. El análisis de los datos recolectados contribuirá como base para futuros estudios que favorezcan a los pacientes diabéticos para el uso de estas proteínas como biomarcadores y terapia blanco de nuevas alternativas terapéuticas para la prevención de cataratas.
<i>Periodo de estudio o duración</i>	Abril 2020 – Enero 2022
<i>Descripción de los métodos a emplear y su propósito</i>	Se obtendrán muestras de sangre por punción de vena periférica el día de la cirugía durante la canalización del paciente en hospitalización y colocadas en un tubo rojo y un tubo morao con EDTA. Para la toma de muestra de humor acuoso se aplicarán procedimientos de asepsia y antisepsia en se coloca anestesia tópica y blefarostato en quirófano previo a la cirugía de catarata, el paciente deberá estar en decúbito supino, bajo microscopía se realizará paracentesis de la cámara anterior con una jeringa de insulina de 30 Gauge, en el limbo temporal. Se obtendrán 150-200 mcl de humor acuoso y posteriormente se extraerá la aguja. Se almacenará la muestra en tubos Eppendorf. Las muestras para análisis de GFAP y NRF2 serán almacenadas a 2-8°C por 2 horas, y se almacenarán posteriormente de -20°C a -80°C. Las muestras serán analizadas con kit ELISA de NRF2 humano y GFAP humano.
<i>Beneficios esperados:</i>	Determinar la correlación de expresión de proteínas NRF2 y GFAP en plasma y humor acuoso con el desarrollo de catarata en pacientes con diabetes mellitus tipo2.
<i>Alternativas:</i>	No participar en el estudio.
<i>Riesgos o molestias:</i>	La toma de muestra de humor acuoso bajo anestesia no debe generar dolor. En casos excepcionales puede lesionarse alguna estructura intraocular como iris , cápsula anterior de cristalino, hiphema o daño al endotelio corneal. En el momento de la toma de muestra de sangre por venopunción, sentirá un leve dolor al pinchazo. En casos esporádicos se podrían presentar complicaciones de este procedimiento, como hematoma y/o dolor leve , los cuales mejorarán espontáneamente o con medidas locales. En casos excepcionales,

	este dolor podría ser más severo y persistente o presentarse inflamación de la vena, infección o trombosis localizadas.
<i>Grupo de referencia</i>	Si
<i>Gastos</i>	Los gastos del estudio serán cubiertos por Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz IAP.
<i>Confidencialidad</i>	Su identidad y la información que proporcione como parte de esta investigación serán tratadas bajo criterios de confidencialidad. En caso de que los resultados exijan su identificación, previamente se le solicitará la autorización correspondiente.
<i>Dudas, aclaraciones y actualización</i>	El participante tendrá derecho a recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y su tratamiento. Es importante que sepa que retirar su participación no afectará su atención en el hospital.

Por este medio manifiesto mi satisfacción con la información recibida y, consciente de las especificaciones y en qué consiste la investigación descrita en este documento, sus beneficios, riesgos y consecuencias, **otorgo mi consentimiento para incorporarme a ella, asumiendo el compromiso de asistir puntualmente a las citas que se me indiquen y proporcionar verazmente la información de mi evolución en la forma y periodicidad que se requiera.**

Asimismo, entiendo que puedo retirarme de esta investigación voluntariamente en cualquier momento sin mayor requisito que la manifestación al investigador principal o a la Dirección Médica de este hospital.

Ciudad de México a ___ de _____ de ____.

Firma del paciente

Testigos

Nombre y firma

Nombre y firma

ANEXO 2

	Marzo 2020	Abril 2020	Mayo- Junio 2020	Julio- Agosto 2020	Septiembre- Octubre 2020	Noviembre- Diciembre 2020	Septiembre- Octubre 2021
Entrega y corrección de protocolo	X	X					
Llenado de base de datos			X	X	X	X	
Toma de muestras			X	X	X	X	
Análisis de datos							X
Entrega de resultados							X
Conclusión							X