



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Asociación para Evitar la Ceguera en México**

**DETERMINACIÓN DE NIVELES DE FIBULINAS 5 Y 7 EN  
HUMOR ACUOSO DE PACIENTES CON DEGENERACIÓN  
MACULAR RELACIONADA A LA EDAD (DMRE)**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL:  
TÍTULO DE ESPECIALISTA

EN:  
**OFTALMOLOGÍA**

PRESENTA:  
**HILLARY KIMBERLY OSORIO LANDA**

ASESOR HUGO QUIROZ MERCADO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 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.

## ÍNDICE

1. SINOPSIS DEL PROTOCOLO.....	Pág. 3
2. FORMATO 1. Carátula para registro de proyectos de investigación.....	Pág. 5
3. FORMATO 2. Colaboradores.....	Pág. 6
4. FORMATO 3. Proyecto.....	Pág. 7
5. RESUMEN ESTRUCTURADO.....	Pág. 9
6. MARCO TEÓRICO.....	Pág. 11
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	Pág. 13
8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	Pág. 13
9. CONTRIBUCIÓN DEL PROYECTO.....	Pág. 13
10. HIPÓTESIS.....	Pág. 14
11. OBJETIVOS.....	Pág. 14
12. TIPO DE ESTUDIO.....	Pág. 14
13. MATERIALES Y MÉTODOS.....	Pág. 14
14. RESULTADOS.....	Pág. 19
15. DISCUSIÓN.....	Pág. 26
16. LIMITACIONES.....	Pág. 27
17. CONCLUSIONES.....	Pág. 28
18. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	Pág. 28
19. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES ANUAL.....	Pág. 29
20. INFRAESTRUCTURA.....	Pág. 30
21. ENTREGABLES.....	Pág. 30
22. METAS POR AÑO.....	Pág. 30
23. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Pág. 30
24. FIRMAS DE APROBACIÓN DEL PROTOCOLO.....	Pág. 33
25. ANEXOS	
a. ANEXO 1. Consentimiento informado.....	Pág. 34

## SINOPSIS DEL PROTOCOLO

### TÍTULO

Determinación de niveles de Fibulinas 5 y 7 en humor acuoso de pacientes con Degeneración Macular Relacionada a la Edad (DMRE)

---

### SUBVENCION DE LA INVESTIGACIÓN

Departamento de Investigación. Asociación Para Evitar la Ceguera en México I.A.P.

---

### PROYECTO

Observacional, descriptivo, transversal

---

### INDICACIÓN

Pacientes con DMRE seca (grupo estudio) y sin DMRE (grupo control) que sean sometidos a cirugía de catarata.

---

### OBJETIVOS

**Objetivo Primario:** Determinar y comparar los niveles de expresión (producción) de Fibulinas 5 y 7 en humor acuoso de pacientes con DMRE (grupo estudio) y sin DMRE (grupo control).

**Objetivos Secundarios:**

- Determinar y comparar los niveles de las proteínas fibulinas 5 y 7 en humor acuoso en pacientes con DMRE seca mediante las técnicas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y sistema multiplex (Magpix).
  - Comparar los niveles de expresión de las fibulinas mencionadas en humor acuoso entre pacientes con DMRE seca y el grupo control.
  - Reportar los resultados obtenidos.
- 

### HIPÓTESIS

Los pacientes con DMRE presentarán una menor concentración de Fibulina 5, y una mayor concentración de fibulina 7 en humor acuoso que los pacientes sin DMRE.

---

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Investigación básica, estudio transversal

---

### NÚMERO DE SUJETOS

Muestreo no aleatorio por conveniencia

---

**No. DE CENTROS**

Centro único

**POBLACIÓN OBJETIVO**

Pacientes con DMRE seca (grupo estudio) y sin DMRE (grupo control) que fueron sometidos a cirugía de catarata.

**DURACIÓN DEL ESTUDIO**

Noviembre 2020 a Octubre 2022

**CRITERIOS DE SELECCIÓN****Criterios de Inclusión**

- Pacientes  $\geq 60$  años de edad
- Pacientes que firmen consentimiento informado.
- Grupo de estudio: Pacientes con DMRE (seca) que sean sometidos a cirugía de catarata (facoemulsificación, extracción extracapsular y extracción por pequeña incisión).
- Grupo control: Pacientes sin DMRE que sean sometidos a cirugía de catarata (facoemulsificación, extracción extracapsular y extracción por pequeña incisión).

**Criterios de Exclusión**

- Otra patología retiniana
- Glaucoma
- Antecedente de trauma ocular
- Diabetes mellitus
- Hipertensión arterial
- Muestras insuficientes
- Muestras contaminadas con sangre, azul tripano, viscoelástico, soluciones o fármacos intracamerales
- Mujeres embarazadas y/o lactantes
- Pacientes que no firmen el consentimiento informado

**PROCEDIMIENTO DE ALEATORIZACIÓN****Cálculo de muestra:** Muestreo no aleatorio por conveniencia

## FORMATO I. CARÁTULA PARA REGISTRO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Responsable de la propuesta: Quiroz Mercado Hugo  
Apellido Paterno Apellido materno Nombre(s)

Tipo de Nombramiento: Investigador APEC X Externo

Categoría y nivel: Sistema Nacional de Investigadores (SNI) Nivel 3

Área de adscripción: Retina y vítreo Laboratorio: CEO

Número de Teléfono donde localizarlo: 5528557287 e-mail: hugoquiroz@yahoo.com

### PERTENECE A:

SNI X Nivel 3

Nombre del Proyecto: “Determinación de niveles de fibulinas 5 y 7 en humor acuoso de pacientes con Degeneración Macular Relacionada a la Edad (DMRE)”

Línea de Investigación: Fibulinas en patología retiniana

Fecha de Inicio: Noviembre 2020 Fecha de Término: Octubre 2022

### EN SU PROYECTO UTILIZARÁ O PARTICIPARÁN

SI	X	SI	SI	X	SI	SI						
humanos	NO	animales	NO	X	material genético	NO	material radiactivo	NO	X	micro-organismos	NO	X

## FORMATO II. COLABORADORES

### NOMBRE DEL PROYECTO

“Determinación de niveles de Fibulinas 5 y 7 en humor acuoso de pacientes con Degeneración Macular Relacionada a la Edad (DMRE)”

---

### PARTICIPANTES POR LA ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA IAP

---

Nombre de quien entrega: Hillary Kimberly Osorio Landa Teléfono: 5534463384

NOMBRE Y NOMBRAMIENTO	DEPARTAMENTO	TELÉFONO	TIPO DE PARTICIPACIÓN
Dra. Hillary Kimberly Osorio Landa	Residente de tercer año	5534463384	Investigador responsable
Dr. Hugo Quiroz Mercado	Retina y vítreo	5528557287	Investigador principal
Biól. Luis Fernando Hernández Zimbron	Unidad de investigación	56596572	Co-investigador
Dra. Claudia Corredor Ortega	Segmento anterior	5516379619	Co-investigador
Dr. Roberto González Salinas	Segmento anterior	4422199424	Co-investigador
Dra. Fernanda Golzarri	Becaria de retina y vítreo	5513547952	Co-investigador
Dra. Alejandra González Dibilbox	Segmento anterior	4441881492	Co-investigador
Dr. Ciro Alberto Guadarrama Mejía	Residente primer año	7227091401	Co-investigador
Dra. Alicia Carolina Espinosa Moreno	Residente primer año	5530514152	Co-investigador
Dra. Elizabeth Rueda Torres	Residente primer año	2225354792	Co-investigador
Dr. Pedro Chouciño Brindis	Médico pasante de retina y vítreo	5530089674	Co-investigador

Correo electrónico: hillary411k@gmail.com

### FORMATO III. PROYECTO

Nombre del Proyecto: ”Determinación de niveles de Fibulinas 5 y 7 en humor acuoso de pacientes con Degeneración Macular Relacionada a la Edad (DMRE)”

Línea de Investigación: Fibulinas en patología retiniana

Tipo de investigación:      Biomédica      X      Clínica

Educativa                      Básica      X      Sociomédica

**Responsables:** Dr. Hugo Quiroz Mercado y Dra. Hillary Kimberly Osorio Landa

NOMBRE	INVESTIGADOR	ADSCRIPCIÓN	FUNCIÓN A DESEMPEÑAR
DR. HUGO QUIROZ MERCADO	RESPONSABLE	DPTO. RETINA Y VÍTREO	INVESTIGADOR PRINCIPAL, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PROPUESTA DE PROTOCOLO.
DRA. HILLARY KIMBERLY OSORIO LANDA	CORRESPONSABLE	RESIDENTE DE TERCER AÑO	PLANEACIÓN, ORGANIZACIÓN, EJECUCIÓN Y LOGÍSTICA DEL PROTOCOLO.
BIÓL. LUIS FERNANDO HERNÁNDEZ ZIMBRON	ASOCIADO	UNIDAD DE INVESTIGACIÓN	DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE FIBULINAS EN LAS MUESTRAS DE HUMOR ACUOSO MEDIANTE ELISA Y SISTEMA MULTIPLEX.
DRA. CLAUDIA CORREDOR ORTEGA	ASOCIADO	SEGMENTO ANTERIOR	IDENTIFICACIÓN Y NOTIFICACIÓN A INVESTIGADOR RESPONSABLE DE PACIENTES CON DMRE Y SIN DMRE QUE SERÁN SOMETIDOS A CIRUGÍA DE CATARATA.
DR. ROBERTO GONZÁLEZ SALINAS	ASOCIADO	SEGMENTO ANTERIOR	METODOLOGÍA, LOGÍSTICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS.
DRA. FERNANDA GOLZARRI	ASOCIADO	BECARIA DEL DPTO. RETINA Y VÍTREO	ASESOR TEÓRICO DE INVESTIGADOR RESPONSABLE, EJECUCIÓN





## RESUMEN ESTRUCTURADO

**Título:** Determinación de niveles de Fibulinas 5 y 7 en humor acuoso de pacientes con Degeneración Macular Relacionada a la Edad (DMRE)

### Objetivos:

**Objetivo general:** Determinar y comparar los niveles de expresión (producción) de Fibulinas 5 y 7 en humor acuoso de pacientes con DMRE (grupo estudio) y sin DMRE (grupo control).

### Objetivos particulares:

- Determinar y comparar los niveles de las proteínas Fibulinas 5 y 7 en humor acuoso en pacientes con DMRE seca mediante las técnicas de ELISA y sistema multiplex (Magpix).
- Comparar los niveles de expresión de las fibulinas mencionadas en humor acuoso entre pacientes con DMRE seca y el grupo control.
- Reportar los resultados obtenidos.

### Materiales y Métodos:

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal de Noviembre 2020 a Octubre 2022 en la Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P. Durante este periodo, se seleccionó pacientes  $\geq 60$  años con y sin DMRE (seca) que sean sometidos a cirugía de catarata.

Entre los criterios de inclusión, se encuentran los siguientes:

- Pacientes  $\geq 60$  años de edad
- Pacientes que firmen consentimiento informado.
- Grupo de estudio: Pacientes con DMRE (seca) que sean sometidos a cirugía de catarata (facoemulsificación, extracción extracapsular y extracción por pequeña incisión).
- Grupo control: Pacientes sin DMRE que sean sometidos a cirugía de catarata (facoemulsificación, extracción extracapsular y extracción por pequeña incisión).

Entre los criterios de exclusión, se encuentran los mencionados a continuación:

- Otra patología retiniana
- Glaucoma
- Antecedente de trauma ocular
- Diabetes mellitus
- Hipertensión arterial
- Muestras insuficientes
- Muestras contaminadas con sangre, azul tripano, viscoelástico, soluciones o fármacos intracamerales

- Mujeres embarazadas y/o lactantes
- Pacientes que no firmen el consentimiento informado

Se tomó una muestra de humor acuoso de 0.2-0.3 ml (20 – 30 U) mediante un equipo alado mariposa 21G durante la cirugía de catarata previo a la instilación de cualquier sustancia en cámara anterior. Posteriormente, la muestra fue transportada y refrigerada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , con posterior descongelación para el análisis de nivel de expresión de fibulinas mediante técnicas de ELISA y sistema multiplex (Magpix).

### **Consideraciones Éticas:**

El protocolo se inició sólo hasta que se obtuvo la aprobación por parte del Comité de Ética de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, I.A.P. Todos los pacientes fueron reclutados voluntariamente y certificado mediante la firma de consentimiento informado. Este estudio se apegó a la declaración de Helsinki.

### **Análisis:**

Para el análisis de expresión de fibulinas, se realizará un análisis de umbral de ciclo promedio (CT), delta CT y delta-delta CT por paciente y gen (GAPDH, FBLN5 y FBLN7). El software SPSS 20.0 (version 20, SPSS, Inc., Chicago, IL; USA) y GraphPad Prism 8 (GraphPad Software version 8. Inc., La Jolla, CA) serán utilizados para el análisis y la elaboración de los gráficos.

**Palabras clave:** Fibulinas, degeneración macular relacionada a la edad, humor acuoso

---

## MARCO TEÓRICO

La degeneración macular relacionada a la edad (DMRE) constituye una de las principales causas de ceguera a nivel mundial.<sup>1</sup> Se considera la principal causa de ceguera permanente e irreversible en pacientes mayores de 50 años en países de Europa y América del Norte.<sup>2</sup> El número proyectado de personas con DMRE en 2020 es de 196 millones, aumentando a 288 millones para el 2040.<sup>3</sup>

La DMRE se caracteriza por la formación de depósitos amorfos extracelulares en el espacio entre el epitelio pigmentario retiniano (EPR) y la membrana de Bruch llamados drusas. El depósito generalizado de drusas se asocia con disfunción de las células del EPR y degeneración de los fotorreceptores.<sup>4</sup>

Existen múltiples sistemas de clasificación para la DMRE, siendo uno de los más usados el propuesto por el “Age-Related Eye Disease Study (AREDS)”, un ensayo clínico de los institutos nacionales de salud (NIH). La DMRE temprana se caracteriza por pocas (<20) drusas de tamaño mediano ( $>63 \mu\text{m}$  y  $\leq 125 \mu\text{m}$ ) o anomalías del EPR. La DMRE intermedia se caracteriza por al menos una drusa grande ( $>125 \mu\text{m}$ ), numerosas medianas o atrofia geográfica que no se extiende hacia el centro de la mácula.<sup>5,6</sup>

La DMRE avanzada se divide en no neovascular (seca, atrófica o no exudativa) o neovascular (húmeda o exudativa). La avanzada seca se define por drusas y atrofia geográfica que se extienden al centro de la mácula, y, por último, la avanzada húmeda se caracteriza por neovascularización coroidea.<sup>5,6</sup>

En la DMRE temprana, la disminución de agudeza visual suele ser leve e incluso asintomática. Otros síntomas incluyen visión borrosa, escotomas, disminución de la sensibilidad al contraste, adaptación anormal a la oscuridad, y necesidad de mayor iluminación o magnificación adicional a la visión cercana. La DMRE avanzada seca se caracteriza por disminución de agudeza visión gradual, insidiosa con escotomas centrales o paracentrales en un transcurso de meses a años.<sup>5</sup>

En cambio, pacientes con DMRE avanzada húmeda suelen referir disminución de la visión profunda y súbita en días a semanas como resultado de hemorragia subretiniana o acúmulo de líquido secundario a neovascularización coroidea.<sup>5</sup>

La identificación de factores de riesgo modificables y el desarrollo de futuros tratamientos preventivos son cruciales, debido a que actualmente no hay un tratamiento disponible para la DMRE seca y el envejecimiento de la población dará como resultado un aumento importante de la carga de DMRE tanto en las familias como en el nivel socioeconómico y servicio de salud.<sup>7</sup>

El estudio AREDS, un ensayo clínico aleatorizado doble enmascarado y multicéntrico evaluó en 3,640 pacientes el efecto de suplementos alimenticios orales (vitamina C 500 mg, vitamina E 400 IU,  $\beta$ -caroteno 15 mg, óxido de zinc 80 mg y óxido cúprico 2 mg) en la progresión de la DMRE, y

observaron que se redujo significativamente las probabilidades de desarrollar DMRE avanzada en personas con características de alto riesgo.<sup>8</sup> A pesar de estos resultados, la DMRE seca no tiene un tratamiento aprobado, por lo que los esfuerzos para comprender la fisiopatología son múltiples con el fin de desarrollar nuevos tratamientos.<sup>7</sup>

Se ha demostrado que la DMRE es un trastorno multifactorial cuya patogénesis se caracteriza por una desregulación en las vías de complemento, lípidos, angiogénesis, inflamación y de la matriz extracelular.<sup>9</sup> Tanto la detección como el tratamiento oportuno son fundamentales para conservar una visión adecuada y funcional, y así mantener la calidad de vida de los pacientes. No obstante, a pesar de la gama creciente en investigación de opciones terapéuticas para esta enfermedad, actualmente no existe una terapia curativa.<sup>10</sup>

Además, aunque la monitorización domiciliar de los cambios en el campo visual central suele recomendarse mediante una rejilla de Amsler para detectar la presencia de metamorfopsias o escotomas en personas con DMRE seca, la sensibilidad de la rejilla de Amsler para revelar enfermedad macular puede ser subóptima.<sup>7</sup>

Por otro lado, el tratamiento habitual de la DMRE húmeda constituye la aplicación de anti-VEGF intravítreos como el Ranibizumab (Lucentis, Genentech) y Bevacizumab (Avastin, Genentech).<sup>5</sup> Se ha demostrado que tanto el Ranibizumab como el Bevacizumab tienen efectos equivalentes en la agudeza visual de los pacientes tratados.<sup>11</sup> No obstante, hasta ahora, ninguno de los tratamientos utilizados podría curar la enfermedad o revertir su curso.<sup>7</sup>

Como se mencionó con anterioridad, en la patogénesis de la DMRE se atribuye un papel importante a los trastornos en la regulación de proteínas de la matriz extracelular, entre ellos se encuentran las llamadas fibulinas.<sup>2,12</sup> Las fibulinas constituyen proteínas de la matriz extracelular que son importantes componentes de las fibras elásticas y membranas basales.<sup>12</sup>

Las fibulinas contribuyen a la adhesión y migración celular, así como a la interacción del receptor de la superficie celular de la integrina. Se dividen en 2 clases: La clase I incluye las fibulinas 1, 2, y 6, que comparten la presencia de un dominio N-terminal adicional, y la clase II incluye fibulinas más cortas como la 3,4,5, y 7, que se caracterizan por menos repeticiones de EGF que se unen al calcio.<sup>12</sup>

Diversos estudios han evaluado la expresión de fibulinas en la DMRE, con el objetivo de sentar las bases moleculares para diseñar una opción terapéutica para los pacientes con este padecimiento ocular.<sup>13-20</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La DMRE constituye una de las principales causas de ceguera a nivel mundial.<sup>1</sup> Se considera la principal causa de ceguera permanente e irreversible en pacientes mayores de 50 años en países de Europa y América del Norte.<sup>2</sup> El número proyectado de personas con DMRE en 2020 es de 196 millones, aumentando a 288 millones para el 2040.<sup>3</sup>

Considerando la carga global de morbilidad por este padecimiento oftalmológico, tanto la detección como el tratamiento oportuno son fundamentales; sin embargo, actualmente no existe ningún tratamiento que pueda curar la enfermedad o revertir su curso.<sup>7,10</sup>

Esto se observa principalmente en la forma seca de la DMRE, debido a que no tiene un tratamiento aprobado, los suplementos alimenticios tienen resultados variables y la sensibilidad de la monitorización domiciliaria con la rejilla de Amsler resulta subóptima para revelar enfermedad macular, resultando en la progresión de la enfermedad.<sup>7</sup>

Se ha descrito que existen alteraciones en la expresión de genes asociados a adhesión y migración celular; sin embargo, se desconoce cuáles son los cambios en estas proteínas asociadas a DMRE.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los niveles de expresión (producción) de fibulinas 5 y 7 en humor acuoso en pacientes con y sin DMRE?

## **CONTRIBUCIÓN DEL PROYECTO EN EL AVANCE DEL CONOCIMIENTO EN SU PROPIA TEMÁTICA Y EN SU ÁREA DE CONOCIMIENTO**

La determinación de los niveles de expresión (producción) de fibulinas en el humor acuoso de pacientes con y sin DMRE podría establecer las bases para el desarrollo de una nueva opción terapéutica dirigida a estas proteínas. Igualmente, podría constituir un tratamiento más eficaz que los complejos multivitamínicos en DMRE seca y más seguro que la aplicación de antiangiogénicos en DMRE húmeda.

Así mismo, y en el mejor de los casos, podría establecer una forma de retrasar o detener la progresión de la enfermedad, incluso de revertir su curso. Hasta donde tenemos conocimiento, este estudio constituye el primero en determinar los niveles de expresión de fibulinas en humor acuoso en pacientes con DMRE.

## **HIPÓTESIS**

Los pacientes con DMRE presentarán una menor concentración de fibulina 5, y una mayor concentración de fibulina 7 en humor acuoso que los pacientes sin DMRE.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Determinar y comparar los niveles de expresión (producción) de fibulinas 5 y 7 en humor acuoso de pacientes con DMRE (grupo estudio) y sin DMRE (grupo control).

### **Objetivos particulares:**

- Determinar y comparar los niveles de las proteínas fibulinas 5 y 7 en humor acuoso en pacientes con DMRE seca mediante las técnicas de ELISA y sistema multiplex (Magpix).
- Comparar los niveles de expresión de las fibulinas mencionadas en humor acuoso entre pacientes con DMRE seca y el grupo control.
- Reportar los resultados obtenidos.

## **TIPO DE ESTUDIO**

Investigación básica. Estudio observacional, descriptivo y transversal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal de Noviembre 2020 a Octubre 2022 en la Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P. Durante este periodo, se seleccionó a pacientes  $\geq 60$  años con y sin DMRE (seca) que fueron sometidos a cirugía de catarata, mediante las técnicas quirúrgicas de facoemulsificación, extracción extracapsular y extracción por pequeña incisión. La selección de estos pacientes se llevó a cabo mediante muestreo no aleatorio por conveniencia.

Entre los criterios de inclusión, se encontraron los siguientes:

- Pacientes  $\geq 60$  años de edad

- Pacientes que firmen consentimiento informado.
- Grupo de estudio: Pacientes con DMRE (seca y húmeda) que sean sometidos a cirugía de catarata (facoemulsificación, extracción extracapsular y extracción por pequeña incisión).
- Grupo control: Pacientes sin DMRE que sean sometidos a cirugía de catarata (facoemulsificación, extracción extracapsular y extracción por pequeña incisión).

Entre los criterios de exclusión, se encontraron los mencionados a continuación:

- Otra patología retiniana
- Glaucoma
- Antecedente de trauma ocular
- Diabetes mellitus
- Hipertensión arterial
- Muestras insuficientes
- Muestras contaminadas con sangre, azul tripano, viscoelástico, soluciones o fármacos intracamerales
- Mujeres embarazadas y/o lactantes
- Pacientes que no firmen el consentimiento informado

Posterior a la firma de consentimiento informado y una vez que el paciente se encontró en quirófano con previa asepsia y antisepsia con campos estériles colocados, se tomó una muestra de humor acuoso de 0.2-0.3 ml con un equipo alado mariposa calibre 21G previo a la instilación de cualquier fármaco, tinción o sustancia.

La mariposa 21G fue etiquetada con el nombre completo del paciente, el número de expediente, diagnóstico (con o sin DMRE) y la fecha de la toma. Fue transportada al laboratorio inmediatamente en una hielera para después ser almacenada en un refrigerador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , posteriormente fue descongelada para determinar los niveles de expresión (producción) de fibulinas 5 y 7 mediante las técnicas de ELISA y sistema multiplex (Magpix). El sistema multiplex es un dispositivo que sirve para determinar niveles de proteínas de manera selectiva, cuya lectura requiere equipo lector multiplacas Magpix, el cual se encuentra disponible en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, al cual como investigadores contamos con acceso libre.

Para la ejecución del inmunoensayo Multiplex (Magpix), primero se preparó el antígeno estándar. Posteriormente, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de imanes y gránulos magnéticos, previamente centrifugados por 30 segundos. Se lavó la laminilla y se agregan 50  $\mu\text{L}$  de estándares, controles o muestras. Se selló la laminilla y se incubó la muestra a temperatura ambiente por 60-120 minutos, luego se agregó el anticuerpo de detección (25  $\mu\text{L}$ ) y se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 30 minutos.

Se añadió *Streptavidin-PE* (50  $\mu\text{L}$ ) y se incubó otros 30 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendieron los imanes y gránulos magnéticos y se agregó 120  $\mu\text{L}$  de buffer lector. Se agitó a



temperatura ambiente por 5 minutos y finalmente se obtuvo el resultado mediante el sistema Magpix.

Una vez identificados los niveles de expresión de fibulinas, fueron entre pacientes del grupo control y DMRE seca.

### ***Pruebas análisis estadístico***

Para el análisis de expresión de fibulinas, se realizó un análisis de umbral de ciclo promedio (CT), delta CT y delta-delta CT por paciente y gen (GAPDH, FBLN5 y FBLN7). El software SPSS 20.0 (version 20, SPSS, Inc., Chicago, IL; USA) y GraphPad Prism 8 (GraphPad Software version 8. Inc., La Jolla, CA) serán utilizados para el análisis y la elaboración de los gráficos.

### ***Toma y procesamiento de la muestra***

Se diseñó un *checklist* estructurado para estandarizar la extracción y el procesamiento de la muestra, el cual se siguió ordenadamente para cada paciente y éste se presenta a continuación:

<b>Extracción de la muestra</b>	
1. Firma de consentimiento informado	
2. Identificación de paciente correcto	
3. Solicitar y explicar toma de muestra a médico previo al inicio de cirugía	
4. Entrega de equipo alado mariposa calibre 21 G a enfermera para que la coloque en charola estéril	
5. Si la toma se hará <b>previo a inserción</b> de cuchillete: <b>IDEAL</b> Insertar aguja de mariposa en cámara anterior Aspirar 0.2-0.3 ml (20 – 30 U) de humor acuoso con aguja de insulina Retirar aguja de cámara anterior Colocar capuchón de aguja y tapón al adaptador Entregar muestra al pasante encargado	
6. Si la toma se hará <b>posterior a inserción</b> de cuchillete: Insertar aguja de mariposa en cámara anterior mediante el puerto accesorio Aspirar 0.2-0.3 ml (20 – 30 U) de humor acuoso con aguja de insulina Retirar aguja de cámara anterior	

Colocar capuchón de aguja y tapón al adaptador Entregar muestra al pasante encargado	
7. Colocar nombre del paciente y número de expediente en mariposa con cinta adhesiva	
8. Meter muestra inmediatamente en termo con hielo (bien cubierto en hielo 4°C)	
9. Transportar inmediatamente al CEO	

**Tabla 1.** Checklist de pasos a seguir para la correcta extracción de la muestra

<b>Procesamiento de la muestra</b>	
10. Avisar número de muestras a entregar (rango de horario). Un día antes y confirmar en la mañana.	
11. Enfriar la centrífuga	
12. Pasar la muestra a microtubos estériles 0.6 mL	
13. Centrifugar la muestra a 10,000 rpm a 4°C	
14. Separar las fracciones (celular y sobrenadante)	
15. Agregar 50 mcL de Tri reagent al botón celular	
16. Colocar fracción celular en RNA shield y guardar muestra a -80°C	
17. Fracción sobrenadante congelarla a -20 °C	
18. Extracción de RNA de las muestras y almacenamiento	
19. Síntesis de cDNA	
20. PCR tiempo real	

**Tabla 2.** Checklist de pasos a seguir para el correcto procesamiento de la muestra

Igualmente, se determinó la toma de OCT macular y fotografía con Optoscan de cada paciente a la semana de seguimiento postoperatorio con el fin de confirmar en el grupo de estudio la presencia de DMRE y en el grupo control la ausencia de la misma.

<b>Seguimiento clínico pacientes TODOS (1 semana postoperatorio)</b>	
21. Toma de OCT macular	
22. Toma de fotografía de fondo de ojo con Optoscan	

**Tabla 3.** Seguimiento clínico a la semana postoperatorio

Se realizó prueba de extracción inicialmente con jeringa de insulina o cánula; sin embargo, observamos que la extracción de muestra resultaba insuficiente y/o era más difícil para el cirujano.

Por lo tanto, se cambió a uso de equipo alado mariposa calibre 21G, el cual se mantuvo como método ideal de obtención de muestra.



*Imagen 1. Extracción de muestra intraoperatoria de humor acuoso mediante mariposa 21G.*



*Imagen 2. Equipo alado mariposa calibre 21 G.*

## RESULTADOS

Con previa firma de consentimiento informado, se recolectaron muestras de humor acuoso de un total de 82 pacientes; sin embargo, se eliminaron 11 pacientes por patología ocular presente no reportada en el expediente o no diagnosticada previamente, entre ellos, agujero y pseudoagujero macular, cicatriz coriorretiniana, degeneración coroidomiopica por miopía alta, síndrome de tracción vitreomacular, glaucoma, entre otros; y/o ausencia de drusas demostradas por OCT macular. Lo último descartaba el diagnóstico de DMRE, por lo que esos pacientes se eliminaron del grupo de estudio.

Por lo tanto, contamos con un total actualmente de 71 muestras de humor acuoso ( $n=71$ ), de los cuales 38 pacientes pertenecen al grupo control (sin DMRE) y 33 al grupo de estudio (con DMRE). Todos los pacientes cuentan con OCT macular y fotografía de fondo de ojo con Optoscan a la semana del postoperatorio, con el grupo de estudio evidenciando la presencia de drusas maculares y así confirmando el diagnóstico de DMRE.

	Total	Extracción ARN	Faltan Extracción ARN
Grupo Control	38	22	16
Grupo Estudio	33	20	13

<b>Total</b>		<b>71</b>	42	29
--------------	--	-----------	----	----

**Tabla 4.** *Pacientes subdivididos por grupo control y grupo estudio, así como por extracción de ARN finalizada y extracción de ARN faltante.*

Todas las muestras fueron llevadas al CEO para su correcta refrigeración y almacenamiento. Hasta el momento, se ha realizado la extracción de ARN de 42 muestras de humor acuoso (22 del grupo control y 20 del grupo de estudio), por lo que nos faltan procesar un total de 29 muestras (16 del grupo control y 13 del grupo de estudio).

A continuación, se presenta una tabla con los 38 pacientes pertenecientes al grupo control, en el que se muestra la extracción de ARN de 22 pacientes (*Tabla 5*).

Paciente	Edad	Ojo	Sexo	Grupo	Fecha procesamiento ARN	Sample Read ARN PRIMER POZO LECTURA (ng/ $\mu$ L)	Sample Read ARN SEGUNDO POZO LECTURA (ng/ $\mu$ L)	Sample Read ARN PROMEDIO RESULTADOS (ng/ $\mu$ L)
1	90	Derecho	Femenino	Control	03/12/20	2.616	1.052	1.834
2	67	Derecho	Femenino	Control	03/12/20	1.155	1.210	1.183
3	68	Izquierdo	Femenino	Control	03/12/20	7.233	7.013	7.123
4	66	Derecho	Masculino	Control	18/12/20	8.028	8.051	8.040
5	60	Izquierdo	Femenino	Control	18/12/20	3.808	3.560	3.684
6	65	Derecho	Femenino	Control	18/12/20	1.494	1.207	1.351
7	79	Izquierdo	Masculino	Control	18/12/20	1.420	1.31	1.420
8	74	Derecho	Femenino	Control	18/12/20	1.983	5.120	3.552
9	64	Izquierdo	Femenino	Control	29/06/21	2.255	5.239	3.747
10	71	Derecho	Femenino	Control	26/11/21	3.103	1.518	2.311
11	76	Derecho	Masculino	Control	26/11/21	3.001	2.112	2.557
12	76	Izquierdo	Masculino	Control	26/11/21	0.614	0.780	0.780
13	74	Derecho	Femenino	Control	2/12/21	4.277	5.477	4.877
14	81	Izquierdo	Femenino	Control	2/12/21	2.238	2.120	2.179
15	77	Derecho	Femenino	Control	2/12/21	4.253	4.502	4.378
16	74	Derecho	Masculino	Control	2/12/21	4.988	4.991	4.990
17	63	Izquierdo	Masculino	Control	2/12/21	2.385	3.051	2.718
18	60	Derecho	Femenino	Control	2/12/21	1.784	4.045	2.915
19	68	Izquierdo	Femenino	Control	2/12/21	1.308	1.878	1.593
20	67	Izquierdo	Femenino	Control	2/12/21	3.754	2.414	3.084
21	62	Derecho	Masculino	Control	2/12/21	1.011	1.905	1.458
22	88	Izquierdo	Femenino	Control	2/12/21	3.712	3.397	3.555
23	73	Izquierdo	Masculino	Control				
24	77	Derecho	Femenino	Control				
25	66	Derecho	Femenino	Control				
26	69	Derecho	Femenino	Control				
27	69	Izquierdo	Femenino	Control				
28	87	Derecho	Masculino	Control				
29	87	Izquierdo	Masculino	Control				
30	79	Derecho	Masculino	Control				
31	66	Izquierdo	Masculino	Control				
32	73	Derecho	Masculino	Control				
33	67	Izquierdo	Masculino	Control				
34	69	Derecho	Femenino	Control				
35	68	Izquierdo	Femenino	Control				
36	61	Izquierdo	Masculino	Control				
37	69	Izquierdo	Femenino	Control				
38	91	Derecho	Masculino	Control				

*Tabla 5. Grupo control (38 pacientes). Extracción de ARN en ng/ $\mu$ L en 22 pacientes.*

A continuación, se presenta una tabla con los 33 pacientes pertenecientes al grupo de estudio, en el que se muestra la extracción de ARN de 20 pacientes (Tabla 6).

Paciente	Edad	Ojo	Sexo	Grupo	Fecha procesamiento ARN	Sample Read ARN PRIMER POZO LECTURA (ng/ $\mu$ L)	Sample Read ARN SEGUNDO POZO LECTURA (ng/ $\mu$ L)	Sample Read ARN PROMEDIO RESULTADOS (ng/ $\mu$ L)
1	79	Izquierdo	Femenino	Estudio	29/06/21	2.552	3.318	2.935
2	90	Derecho	Masculino	Estudio	29/06/21	2.315	4.005	3.160
3	76	Derecho	Femenino	Estudio	26/11/21	7.156	8.724	7.941
4	76	Izquierdo	Femenino	Estudio	26/11/21	3.694	4.247	3.971
5	80	Derecho	Femenino	Estudio	26/11/21	5.219	4.068	4.644
6	77	Izquierdo	Femenino	Estudio	26/11/21	4.823	3.180	4.002
7	68	Izquierdo	Femenino	Estudio	26/11/21	2.808	2.934	2.871
8	96	Izquierdo	Femenino	Estudio	26/11/21	2.417	3.548	2.983
9	81	Izquierdo	Masculino	Estudio	26/11/21	1.166	2.620	1.893
10	69	Izquierdo	Femenino	Estudio	26/11/21	2.010	1.975	1.993
11	72	Izquierdo	Masculino	Estudio	26/11/21	0.926	0.942	0.934
12	77	Derecho	Femenino	Estudio	2/12/21	2.799	2.937	2.868
13	79	Izquierdo	Femenino	Estudio	2/12/21	1.933	2.212	2.073
14	82	Izquierdo	Masculino	Estudio	2/12/21	3.539	1.643	2.591
15	73	Derecho	Femenino	Estudio	2/12/21	7.655	8.847	8.251
16	71	Izquierdo	Masculino	Estudio	2/12/21	2.255	3.334	2.795
17	86	Izquierdo	Femenino	Estudio	2/12/21	2.084	2.984	2.534
18	89	Derecho	Femenino	Estudio	2/12/21	2.792	1.983	2.388
19	84	Derecho	Femenino	Estudio	2/12/21	3.218	2.803	3.011
20	75	Izquierdo	Femenino	Estudio	2/12/21	3.016	2.528	2.772
21	73	Izquierdo	Masculino	Estudio				
22	79	Derecho	Femenino	Estudio				
23	86	Derecho	Masculino	Estudio				
24	77	Izquierdo	Femenino	Estudio				
25	76	Derecho	Femenino	Estudio				
26	86	Derecho	Femenino	Estudio				
27	87	Derecho	Masculino	Estudio				
28	64	Izquierdo	Masculino	Estudio				
29	76	Izquierdo	Masculino	Estudio				
30	74	Izquierdo	Masculino	Estudio				
31	78	Derecho	Masculino	Estudio				
32	76	Izquierdo	Masculino	Estudio				
33	81	Derecho	Femenino	Estudio				

**Tabla 6.** Grupo estudio (33 pacientes). Extracción de ARN en ng/ $\mu$ L en 20 pacientes.

En la siguiente tabla, se muestran las características demográficas de la población, junto con los métodos empleados para la obtención de la muestra de humor acuoso intraoperatoria por grupo control y estudio.

Características	Grupo control (n= 38)	Grupo estudio (n= 33)
Edad (años) (min-máx)	72 (60 – 91)	78 (64 – 96)
Género (%)		
Femenino	22 (57.89%)	20 (60.60%)

	Masculino	16 (42.10%)	13 (39.39%)
<b>Ojo</b>			
	Derecho	20 (52.63%)	14 (42.42%)
	Izquierdo	18 (47.36%)	19 (57.57%)
<b>Técnica quirúrgica</b>			
	Faco + LIO	38 (100%)	33 (100%)
<b>Obtención de muestra</b>			
	Mariposa	13 (34.21%)	21 (63.53%)
	Cuchillete + mariposa	24 (63.15%)	9 (27.27%)
	Cuchillete + cánula	1 (2.63%)	3 (9.09%)

**Tabla 7.** Características de la población total y de la obtención de muestra.

En el análisis preliminar, se realizó PCR en tiempo real (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR; qRT-PCR) para evaluar la expresión de ARN mensajero (ARNm) de fibulina 5 (FBLN 5) y fibulina 7 (FBLN 7). Se analizaron 12 pacientes, de los cuales 6 pacientes fueron del grupo de estudio (DMRE) y 6 pacientes fueron del grupo control (sin DMRE). Las características del grupo analizado se muestran en la *Tabla 8*.

Características	Grupo control (n= 6)	Grupo estudio (n= 6)
<b>Edad (años) (min-máx)</b>	78 (74-84)	68 (60-81)
<b>Género (%)</b>		
	Femenino	5 (83.33%)
	Masculino	1 (16.66%)
<b>Ojo</b>		
	Derecho	2 (52.63%)
	Izquierdo	4 (47.36%)
<b>Obtención de muestra</b>		
	Mariposa	4 (66.66%)
	Cuchillete + mariposa	2 (33.33%)
	Cuchillete + cánula	0 (0%)

**Tabla 8.** Características de la subpoblación analizada.

La edad promedio de este subgrupo analizado fue de 78 (74-84) años en el grupo de estudio (DMRE) y 68 (60-81) años en el grupo control. Ambos grupos estuvieron conformados por cinco mujeres y un hombre. Como grupo de control negativo, se utilizó la expresión de GAPDH.

Con los resultados de la amplificación, se realizó un análisis delta CT y delta-delta CT con los resultados que se muestran en la *Tabla 9*.



Grupo	Px	GAPDH		FBLN 5				FBLN 7			
		Av CT	$\Delta$ CT	Av CT	$\Delta$ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{\Delta\Delta$ CT}	Av CT	$\Delta$ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{\Delta\Delta$ CT}
DMRE	1	30.432	-2.082	29.078	-1.354	-1.731	3.3	30.752	0.320	-0.510	1.4
	2	30.981	-2.631	29.565	-1.415	-1.792	3.5	29.827	-1.154	-1.985	4.0
	3	28.155	0.195	29.171	1.016	0.639	0.6	29.480	1.325	0.495	0.7
	4	27.210	1.140	28.375	1.165	0.788	0.6	29.015	1.804	0.974	0.5
	5	28.280	0.070	29.558	1.279	0.902	0.5	29.817	1.537	0.706	0.6
	6	27.529	0.821	29.099	1.571	1.194	0.4	28.679	1.151	0.320	0.8
Control	7	28.013	0.337	29.198	1.185	0.808	0.6	28.966	0.953	0.123	0.9
	8	26.692	1.658	29.241	2.549	2.173	0.2	28.407	1.715	1.715	0.3
	9	27.719	0.631	30.511	2.792	2.415	0.2	30.334	2.615	1.784	0.3
	10	28.085	0.265	29.147	1.061	1.984	0.3	29.618	1.533	0.702	0.6
	11	26.909	1.441	29.270	2.361	1.984	0.3	29.814	2.905	2.074	0.2
	12	30.194	-1.844	29.197	-0.997	-1.374	2.6	32.021	1.827	0.996	0.5

**Tabla 9.** Análisis de umbral de ciclo promedio (CT), delta CT y delta-delta CT por paciente y gen (GAPDH, FBLN5 y FBLN7).

Después de realizar un análisis qRT-PCR del humor acuoso, se encontró una expresión disminuida de FBLN5 y FBLN 7 en pacientes con DMRE seca en comparación con el grupo control sin DMRE. El análisis de expresión total promedio medido en el valor  $2^{\Delta\Delta$ CT para el umbral del ciclo (CT) dio como resultado 1.5 y 1.3 para FBLN5 y FBLN7 respectivamente para el grupo de control, y 0.7 y 0.5 respectivamente para el grupo estudio (Tabla 10).

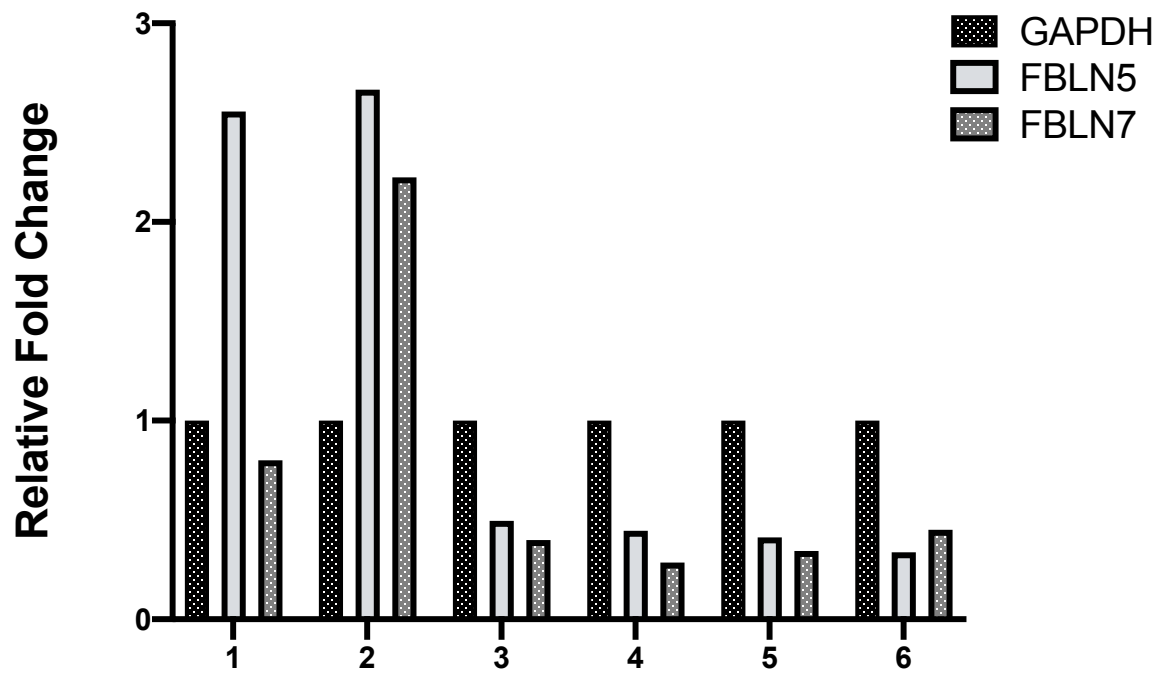
	FBLN5	FBLN7
Control	1.5	1.3
DMRE	0.7	0.5

**Tabla 10.** Análisis de expresión total promedio medido en el valor  $2^{\Delta\Delta$ CT para el umbral del ciclo (CT) de fibulinas 5 y 7 en el grupo control y grupo estudio.

En el análisis de expresión individual, se comparó la expresión de FBLN5 y FBLN7 con la expresión control del gen GAPDH, observando una disminución individual en la expresión de FBLN7 en todos los pacientes y en todos excepto el sujeto 12 del grupo DMRE.

Para el grupo control, los resultados fueron heterogéneos con aumento en los pacientes 1 y 2, y disminución en el resto de pacientes (Figura 1 y 2).

## FBLN5 and FBLN7 Relative Expression in Controls



*Figura 1. Expresión relativa de FBLN5 y FBLN7 en el grupo control (relative fold change analysis).*

## FBLN5 and FBLN7 Relative Expression in AMD

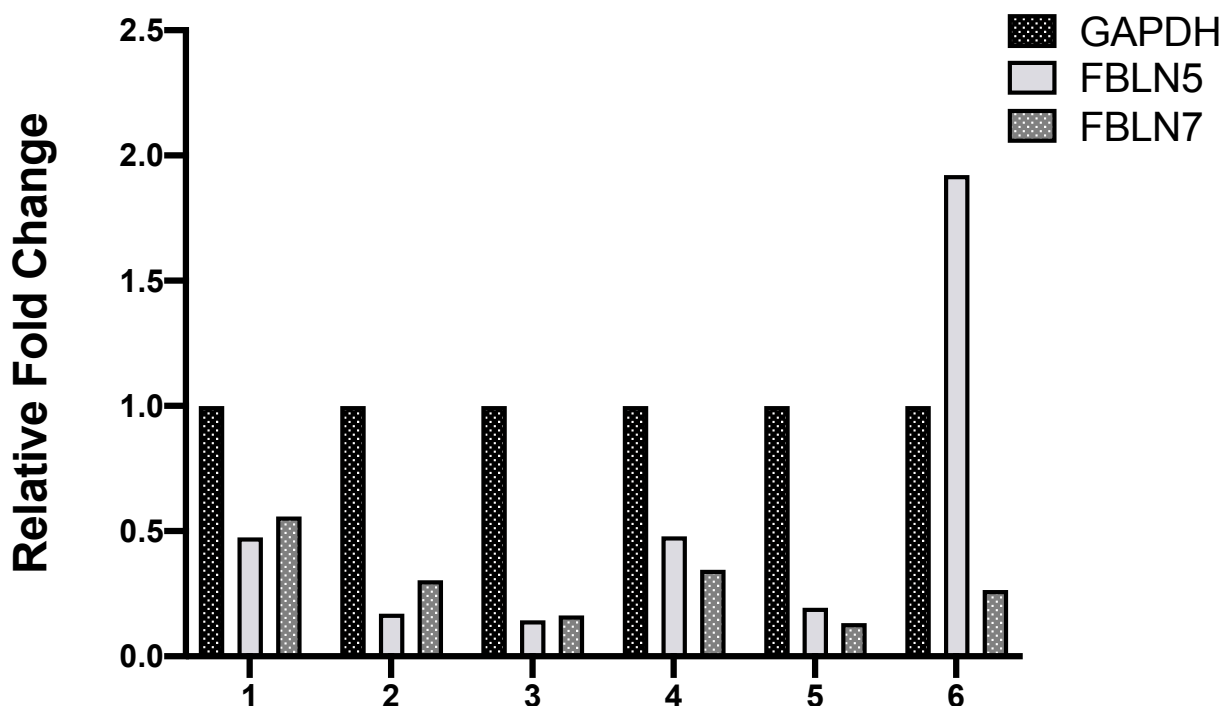


Figura 2. Expresión relativa de FBLN5 y FBLN7 en el grupo estudio (relative fold change analysis).

### DISCUSIÓN

El presente estudio encontró una expresión disminuida de FBLN5 y FBLN7 en pacientes con DMRE en comparación con el grupo de pacientes sin DMRE. Esta menor expresión de FBLN5 fue similar a lo reportado por otros estudios.

Stone et al. reportaron mutaciones con cambio de sentido (*missense*) en un gen que codifica a la proteína extracelular FBLN5 en pacientes con la forma altamente prevalente de DMRE. Ellos asociaron los niveles de expresión de FBLN5 menores con un posible ensamblaje o estabilidad anormal de fibras de elastina en la membrana de Bruch.<sup>13</sup>

Así mismo, Lotery et al. encontraron que la secreción de FBLN5 estaba significativamente reducida ( $p < 0.001$ ) en pacientes con DMRE, probablemente explicado por mutaciones con cambio de sentido causando así una reducción en la elastinogénesis.<sup>14</sup>

Por otro lado, Mullins et al. encontraron que la fibulina 5 estaba localizada en depósitos basales patológicos debajo del EPR, así como en algunas pequeñas drusas. Estos resultados sugieren que la FBLN5 puede promover la formación de depósitos extracelulares en la DMRE.<sup>15</sup>

Incluso, hay estudios que han asociado las mutaciones en fibulina con el tamaño de las drusas (pequeñas, intermedias y grandes). Kucukevcilioglu et al encontraron que los pacientes con DMRE con mutaciones en FBLN5 comparten la estructura fenotípica de las drusas y tienen relaciones dominio hiperfluorescente en la angiografía con fluoresceína /canal verde en imagen a color [hyperfluorescent domain in fluorescein angiography / green channel in color fundus photography; (HD/GC)] similares a las de las personas con drusas cuticulares o laminares basales. La subestructura de las drusas puede reflejar similitudes en la etapa y/o génesis de las drusas y parece variar entre los genotipos de AMD.<sup>16</sup>

Otras fibulinas que se han estudiado en la DMRE son la fibulina 3 y 6.<sup>2, 17, 18</sup> Wyatt et al. determinaron que una interacción entre el factor H del complemento y la fibulina 3 podría contribuir al desarrollo de drusas blandas en algunos pacientes con DMRE y esto podría proporcionar un objetivo de intervención terapéutica en algunas formas de DMRE.<sup>17</sup> Fisher et al. condujeron un estudio en pacientes con DMRE en quienes encontraron una fuerte asociación con el gen HMCN1, el cual codifica para la proteína fibulina 6.<sup>18</sup>

Los niveles de expresión de fibulinas han sido previamente determinados en líquido subretiniano en pacientes con desprendimiento de retina regmatógeno primario<sup>12</sup>. No obstante, hasta donde tenemos conocimiento, sólo dos estudios (además del presente estudio) han identificado fibulinas en humor acuoso. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, no midieron fibulinas en humor acuoso de pacientes con DMRE.

Basu et al. evaluaron la expresión de FBLN7 en humor acuoso en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y ángulo cerrado.<sup>19</sup> Por otro lado, Goel et al. determinaron diversas proteínas en el proteoma del cuerpo ciliar humano normal y en el humor acuoso que no estaban previamente descritas, entre ellas la fibulina 1.<sup>20</sup>

Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que mide la expresión de FBLN5 y FBLN7 en humor acuoso de pacientes con DMRE seca y establece un grupo control para comparación en rango de edad similar.

## **LIMITACIONES**

Este estudio cuenta con diversas limitaciones, las cuales se exponen a continuación. En este estudio se realizó la medición de FBLN5 y FBLN7; sin embargo, hubiera contribuido la medición también de fibulinas 3 y 6 para comparación con otros estudios. Así como este protocolo es novedoso, no existe una amplia gama para comparación con otros estudios prospectivos con similar metodología

al nuestro, lo que limita la discusión del mismo. Igualmente, se podrían medir las fibulinas en pacientes con DMRE húmeda, y no sólo en la variante seca como en este protocolo.

Otra limitación fue que no se analizó el tamaño de drusas de cada paciente respecto a su expresión de fibulinas. Además, la catarata densa en varios pacientes impidió valorar previo a la cirugía patologías oculares que causaron la eliminación de la muestra posterior a haber sido tomada.

La principal limitación de este estudio fue que aún no se finaliza la extracción de ARN y la medición de expresión de FBLN5 y 7 de todas las muestras, debido a que aún no llegan los reactivos necesarios para continuar el procesamiento de las muestras. El equipo de investigadores de este protocolo pretende finalizar el análisis de las muestras en cuanto llegue el equipo faltante.

## **CONCLUSIONES**

En conclusión, se encontró una expresión disminuida de FBLN5 y FBLN7 en muestras de humor acuoso de pacientes con DMRE en comparación con el grupo de pacientes sin DMRE, por lo que se rechazó la hipótesis. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que mide las fibulinas mencionadas en humor acuoso de pacientes con y sin DMRE.

La investigación de fibulinas podría implicar el desarrollo de una nueva terapia para pacientes con DMRE, ya que se han identificado en la patogénesis de este padecimiento ocular altamente incapacitante en etapas avanzadas y hasta el momento no se cuenta con una terapia que pueda curar la enfermedad o revertir su curso.

Se requieren de más estudios prospectivos para definir claramente el papel de las fibulinas en la patogénesis de esta enfermedad y más estudios prospectivos, como éste, que realicen la medición de la expresión de fibulinas.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS Y/O CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN**

El protocolo se inició sólo hasta que se obtuvo la aprobación por parte del Comité de Ética de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, I.A.P. Todos los pacientes serán reclutados voluntariamente y certificado mediante la firma de consentimiento informado. Este estudio se apegó a la declaración de Helsinki. Si un paciente no consiente la toma de muestra durante su cirugía de forma verbal y escrita, no se tomará la muestra.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES ANUAL:

### CRONOGRAMA DE TRABAJO

MES	ACTIVIDADES POR REALIZAR
<b>2020</b>	
<b>Noviembre</b>	Aprobación del protocolo por el Comité de Ética e Investigación. Revisión bibliográfica extensa del tema.
	Logística y capacitación en la toma de muestra de humor acuoso
<b>Diciembre</b>	Creación y diseño de la base de datos. Reclutamiento de los primeros pacientes del protocolo con previa revisión del expediente clínico para confirmar diagnóstico.
<b>2021</b>	
<b>Enero</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reclutamiento de pacientes con previa revisión del expediente clínico</li> <li>• Ingresar los pacientes a la base de datos</li> <li>• Firma del consentimiento informado previo a la toma de muestra</li> <li>• Toma de muestra con adecuado etiquetado y transporte inmediato al laboratorio en una hielera</li> <li>• Refrigeración de la muestra a -80°C</li> <li>• Análisis de las muestras para medir los niveles de expresión de las proteínas fibulinas en humor acuoso mediante las técnicas de ELISA y sistema multiplex (Magpix).</li> </ul>
<b>Febrero</b>	
<b>Marzo</b>	
<b>Abril</b>	
<b>Mayo</b>	
<b>Junio</b>	
<b>Julio</b>	
<b>Agosto</b>	
<b>Septiembre</b>	
<b>Octubre</b>	
<b>Noviembre</b>	
<b>Diciembre</b>	
<b>2022</b>	
<b>Enero</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Continuar reclutamiento de pacientes con y sin DMRE</li> <li>• Análisis de los resultados</li> <li>• Actualización constante de la base de datos</li> <li>• Comparación de los niveles de expresión de fibulinas entre el grupo control, pacientes con y sin DMRE</li> <li>• Interpretación de los resultados</li> <li>• Redacción del artículo final</li> <li>• Publicación de los resultados obtenidos a lo largo de la investigación</li> </ul>
<b>Febrero</b>	
<b>Marzo</b>	
<b>Abril</b>	
<b>Mayo</b>	
<b>Junio</b>	
<b>Julio</b>	
<b>Agosto</b>	
<b>Septiembre</b>	
<b>Octubre</b>	
<b>Noviembre</b>	
<b>Diciembre</b>	

## **INFRAESTRUCTURA**

En el laboratorio se cuenta con la infraestructura necesaria para la realización de este proyecto. El sistema multiplex es un dispositivo que sirve para determinar niveles de proteínas de manera selectiva, cuya lectura requiere equipo lector multiplacas Magpix, el cual se encuentra disponible en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, al cual como investigadores contamos con acceso libre.

## **ENTREGABLES**

Se entregará el formato de consentimiento informado a cada uno de los pacientes.

## **METAS POR AÑO**

- Noviembre – Diciembre 2020: Aprobación del protocolo por el Comité de Ética e Investigación de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, I.A.P. y reclutamiento de los primeros pacientes del protocolo.
- Enero- Diciembre 2021: Reclutamiento de la muestra total de pacientes con y sin DMRE.
- Enero- Octubre 2022: Análisis, interpretación, comparación y difusión de los resultados obtenidos.

## **REFERENCIAS BIBIOLOGRÁFICAS**

1. Lim SL, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. Review Lancet. 2012;379 (9827):1728-38. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
2. Nita M, Strzałka-Mrozik B, Grzybowski A, Mazurek U, Romaniuk W. Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix. Review Med Sci Monit. 2014;20:1003-16. doi: 10.12659/MSM.889887.
3. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. Review Lancet Glob Health. 2014;2(2):e106-16. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
4. Zając-Pytrus HM, Pilecka A, Turno-Kręcicka A, Adamić-Mroczeć J, Misiuk-Hojło M. The Dry Form of Age-Related Macular Degeneration (AMD): The Current Concepts of Pathogenesis and Prospects for Treatment. Review Adv Clin Exp Med. 2015;24(6):1099-104. doi: 10.17219/acem/27093.

5. Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2008;358(24):2606-17. doi: 10.1056/NEJMra0801537.
6. Ferris FL 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR; Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013 Apr;120(4):844-51. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.10.036.
7. Al-Zamil WM, Yassin SA. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Review Clin Interv Aging*. 2017;12:1313-1330. doi: 10.2147/CIA.S143508.
8. AREDS-Study-Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(10):1417-1436.
9. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Review Lancet*. 2018;392(10153):1147-1159. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31550-2.
10. García-Layana A, Cabrera-López F, García-Arumí J, Arias-Barquet L, Ruiz-Moreno JM. Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. *Clin Interv Aging*. 2017 Oct 3;12:1579-1587. doi: 10.2147/CIA.S142685.
11. CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Ying GS, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2011 May 19;364(20):1897-908. doi: 10.1056/NEJMoa1102673.
12. Davila-Avila N, Muñoz-Ruvalcaba FP, Hernandez-Zimbron LF, Gonzalez-Salinas R, Corredor-Ortega C, Perez-Vazquez J, Soberon S, Quiroz-Mercado H. Expression of Fibulin-2 and Fibulin-5 on subretinal fluid in human primary rhegmatogenous retinal detachment. *Exp Eye Res* 2020;194:107992. doi: 10.1016/j.exer.2020.107992.
13. Johnson LV, Anderson DH. Age-related macular degeneration and the extracellular matrix. *N Engl J Med* 2004;351(4):320-2. doi: 10.1056/NEJMp048131.
14. Lotery AJ, Baas D, Ridley C, Jones RP, Klaver CC, Stone E, Nakamura T, Luff A, Griffiths H, Wang T, Bergen AA, Trump D. Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa. *Hum Mutat*. 2006;27(6):568-74. doi: 10.1002/humu.20344.
15. Mullins RF, Olvera MA, Clark AF, Stone EM. Fibulin-5 distribution in human eyes: relevance to age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2007;84(2):378-80. doi: 10.1016/j.exer.2006.09.021.
16. Kucukevcilioglu M, Patel CB, Stone EM, Russell SR. Clinically detectable drusen domains in fibulin-5-associated age-related macular degeneration (AMD): Drusen subdomains in fibulin-5 AMD. *Int Ophthalmol*. 2016;36(4):569-75. doi: 10.1007/s10792-015-0164-5.
17. Wyatt MK, Tsai JY, Mishra S, Campos M, Jaworski C, Fariss RN, Bernstein SL, Wistow G. Interaction of complement factor h and fibulin3 in age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2013 Jun 28;8(6):e68088. doi: 10.1371/journal.pone.0068088.



18. Fisher SA, Rivera A, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, Rudolph G, Weber BH. Case-control genetic association study of fibulin-6 (FBLN6 or HMCN1) variants in age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mutat.* 2007 Apr;28(4):406-13. doi: 10.1002/humu.20464
19. Basu K, Maurya N, Kaur J, Saxena R, Gupta V, Sihota R, Ghosh I. Possible role of differentially expressing novel protein markers (ligatin and fibulin-7) in human aqueous humor and trabecular meshwork tissue in glaucoma progression. *Cell Biol Int.* 2019 Jul;43(7):820-834. doi: 10.1002/cbin.11138
20. Goel R, Murthy KR, Srikanth SM, Pinto SM, Bhattacharjee M, Kelkar DS, Madugundu AK, Dey G, Mohan SS, Krishna V, Prasad TK, Chakravarti S, Harsha HC, Pandey A. Characterizing the normal proteome of human ciliary body. *Clin Proteomics.* 2013 Aug 1;10(1):9. doi: 10.1186/1559-0275-10-9

## **FIRMAS DE APROBACIÓN DEL PROTOCOLO**

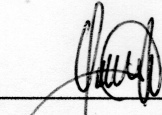
Hemos leído y revisado minuciosamente este Protocolo de Estudio Clínico. Al leerlo hemos entendido los requerimientos y condiciones de este Protocolo de Estudio Clínico. Estamos de acuerdo que este Protocolo de Estudio Clínico llena los requerimientos Internacionales de las Buenas Prácticas Clínicas y los de las Autoridades Regulatorias con respecto a la verificación de los documentos fuente y auditorías/inspección del estudio.

Acordamos que los materiales utilizados en este estudio se encuentran descritos en el protocolo.

Entendemos que los cambios que se realicen al protocolo, tienen que ser hechos en forma de enmiendas, éstas tienen que ser aprobadas de manera escrita por el Dr. Hugo Quiroz Mercado y la Dra. Hillary Kimberly Osorio Landa. Igualmente, acordamos que los tiempos establecidos para la realización de este protocolo deben de ser respetados.

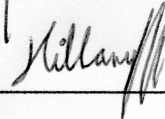
**Investigador Principal:**

Firma



**Responsable:**

Firma



## ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

##### 1. TÍTULO DEL ESTUDIO.

#### **Determinación de niveles de fibulinas 2,3,5 y 7 en humor acuoso de pacientes con Degeneración Macular Relacionada a la Edad (DMRE)**

Investigador Principal / Responsable: Dr. Hugo Quiroz Mercado / Dra. Hillary Kimberly Osorio Landa  
Oftalmología / Unidad de Investigación  
Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP.  
Vicente García Torres 46-S, San Lucas, 04030 Ciudad de México  
Número de teléfono: 5528557287 / 5534463384

POR FAVOR, LEA ESTE FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CON ATENCIÓN. EN EL DOCUMENTO SE PRESENTA INFORMACIÓN RELEVANTE ACERCA DE ESTA INVESTIGACIÓN. SI TIENE DUDAS, PREGUNTE A LOS MÉDICOS ENCARGADOS DEL ESTUDIO ACERCA DE ELLAS.

##### 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO.

Lo/la invitamos a que participe en un estudio de investigación. Los médicos e investigadores de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP Dr. Luis Sánchez Bulnes, están interesados en estudiar los niveles de diferentes proteínas que podrían estar asociados con el desarrollo de la degeneración macular relacionada a la edad en la población mexicana.

El objetivo de este estudio es determinar si existen diferentes niveles de unas proteínas llamadas fibulinas en pacientes con y sin degeneración macular relacionada a la edad, con el fin de establecer si dichas diferencias nos ayudan a plantear las bases para el desarrollo de nuevas opciones de diagnóstico y tratamiento en un futuro.

Este estudio es del conocimiento de las autoridades de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP Dr. Luis Sánchez Bulnes. En este estudio, se incluirán pacientes de 60 años en adelante que firmen este consentimiento. Se planean incluir aproximadamente 20 pacientes con diagnóstico de degeneración macular, así como 20 pacientes sin esta enfermedad que participarán como casos control para comparación, que sean operados de catarata por cualquier técnica quirúrgica (facoemulsificación, extracción extracapsular y extracción por pequeña incisión). No se incluirán en el presente estudio

pacientes con otra patología de retina, antecedente de trauma ocular, diabetes mellitus, hipertensión arterial, con muestra insuficiente o contaminada de humor acuoso (líquido transparente que fluye dentro del ojo), mujeres embarazadas y/o lactantes, y por último, pacientes que no firmen este consentimiento informado.

### **3. ¿QUÉ PASARÁ CONMIGO SI PARTICIPO?**

Si decide participar, al momento de su ingreso al estudio, se le tomará una muestra de humor acuoso (líquido transparente que fluye dentro del ojo) durante su cirugía de catarata. Esta muestra será almacenada y posteriormente procesada para la medición de estas proteínas.

Además de esta única toma de humor acuoso, el personal del estudio recopilará información acerca de su estado de salud. La mayor parte de las veces esta información se obtendrá a través del expediente, pero en otras se le tendrá que preguntar a usted directamente.

Dichos datos personales, así como la muestra biológica obtenida, serán utilizados única y exclusivamente para fines de investigación y serán resguardados bajo los criterios de confidencialidad y uso de datos personales.

### **4. ¿TENGO QUE PARTICIPAR?**

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si Usted no está de acuerdo en participar, no se verá perjudicado(a) de ninguna manera, incluyendo el tratamiento médico y los cuidados que tiene derecho a recibir. Si decide otorgar el consentimiento para participar en el estudio, y una vez iniciado decide que no quiere seguir participando, puede retirar el consentimiento en cualquier momento sin que ello afecte su tratamiento o cuidados médicos.

### **5. ¿QUÉ RIESGOS EXISTEN AL PARTICIPAR?**

La toma de muestra de humor acuoso se realiza con material estéril sin interferir ni perjudicar el resultado de su cirugía de catarata. Durante la toma de muestra, no sentirá ninguna molestia y sólo se extraerá la mínima cantidad de 0.1 mililitros mientras su cirujano lo esté operando. Usted no cursará con molestias durante ni después de la cirugía de catarata provocadas por la toma de muestra. Además, las complicaciones asociadas al procedimiento de la cirugía de catarata son muy escasas.

Es necesario mencionar a usted que este protocolo ha sido evaluado y aprobado por los comités de investigación y ética en investigación de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México I.A.P., además de seguir los lineamientos éticos internacionales.

### **6. ¿CUÁLES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS DE PARTICIPAR?**

Esta información puede ayudar a sus médicos a tomar mejores decisiones en cuanto a la frecuencia de revisiones, inicio de tratamiento o medidas profilácticas. Esta investigación no resultará en un beneficio económico para usted. Con su participación en este estudio, ayudará al avance científico básico para que otros pacientes en el futuro sean diagnosticados y tratados pertinentemente. Dependiendo de los resultados del estudio, en un futuro puede ayudar a que se establezcan ciertas políticas de diagnóstico y manejo que ayuden a otros pacientes como Usted.

## **7. ¿CUÁNTO CUESTA PARTICIPAR?**

El costo de la cirugía de catarata será cubierto por el paciente. El costo de la obtención, almacenamiento y procesamiento de todas las muestras de humor acuoso que serán obtenidas de los participantes serán cubiertas por este estudio.

## **8. ¿CUÁLES SON MIS RESPONSABILIDADES EN ESTE ESTUDIO?**

Mi responsabilidad al participar en este estudio es la de contestar las preguntas realizadas por los doctores del estudio y proporcionar la muestra requerida, así como firmar este consentimiento informado.

## **9. MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Durante el estudio, las muestras biológicas (humor acuoso) serán recogidas, procesadas para la obtención de ADN de estas muestras y reportadas en la Asociación para Evitar la Ceguera, IAP. Todas las muestras identificables serán tratadas de manera tal que se mantenga la confidencialidad del paciente en todo momento. Las muestras de ADN y la información relacionada a este tipo de muestra no será compartida con ninguna otra persona o institución que no esté registrada en este protocolo.

## **10. ¿CÓMO SE USARÁN MIS DATOS PERSONALES?**

Toda la información será recabada, procesada, almacenada y analizada por los investigadores y personal del estudio. Toda la información será tratada de manera confidencial, y de efectuarse alguna publicación de los hallazgos del estudio, los datos de carácter personal no serán identificables.

La información, así como cualquier registro de imagen (fotografías) sólo estarán disponible para los investigadores y personal del estudio. En caso de solicitarlo, las autoridades de la Asociación para Evitar la Ceguera, IAP. podrán tener acceso a la información relacionada con este estudio.

## **11. ¿A QUIÉN DEBO CONTACTAR SI NECESITO MAS INFORMACIÓN O AYUDA?**

En caso de dudas acerca del estudio, por favor póngase en contacto con los investigadores principales:

Nombre de los investigadores: Dra. Hillary Kimberly Osorio Landa, Número de contacto 24 horas: 5534463384

Dr. Hugo Quiroz Mercado, Número de contacto 24 horas; 5528557287

Dirección: Unidad de Investigación, Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP, Vicente García Torres 46-S, San Lucas, 04030 Ciudad de México.

Número de teléfono del Departamento de Investigación: 56 59 65 72

Para aclarar sus dudas sobre sus derechos por participar en un estudio clínico, puede contactar al Comité de Ética en Investigación con el Dr. Everardo Hernández, Presidente y Secretario.

**Comité de Ética en Investigación de Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP**

**Dr. Everardo Hernández, Presidente del Comité de Ética en Investigación.**

**Dirección: Vicente García Torres 46-S, San Lucas, 04030 Ciudad de México Teléfono: 1084-1400, extensión 1303.**

## 12. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO Y AUTORIZACIÓN DEL SUJETO

He recibido información verbal sobre el estudio y he leído la información adjunta por escrito. Me han dado la oportunidad de discutir el estudio y hacer preguntas. Yo voluntariamente doy mi consentimiento para participar en el estudio. Acepto voluntariamente permitir que el personal del estudio recoja, utilice y comparta mi información de salud como se especifica en este formato. Entiendo que puedo negarme a participar o retirarme del estudio en cualquier momento sin que ello repercuta en mis cuidados y atención médica. Acepto libremente participar en el estudio. Recibiré una copia firmada de esta carta de consentimiento informado.

---

Nombre del participante	Firma	Fecha
-------------------------	-------	-------

---

Nombre de quien obtuvo el consentimiento	Firma	Fecha
--	-------	-------

---

Nombre del testigo 1 y parentesco	Firma	Fecha
-----------------------------------	-------	-------

---

Dirección

---

Nombre del testigo 2 y parentesco	Firma	Fecha
-----------------------------------	-------	-------

---

Dirección