



# **UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA DIVISION ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA**

**FUNDACION CONDE DE VALENCIANA**

## **Análisis Comparativo del Proteóma del Angulo Iridocorneal en Pacientes con Glaucoma Primario de Angulo Abierto y Glaucoma Primario de Angulo Cerrado**

**TESIS DE POSGRADO**

**Para obtener el diplomado de especialidad en:**

**OFTALMOLOGÍA**

**PRESENTA A:**

**Dra. Ana Paola López Venegas**

**ASESOR DE TESIS:**

**Dr . Victor Manuel Bautista de Lucio**

**Medico Adscrito del Instituto Conde de Valenciana**



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. Enrique L. Graue Wichers**

**Profesor de curso**

---

**Dr. Victor Manuel Bautista de Lucio**

**Director de tesis**

---

**Dr. José Luis Rodríguez Loaiza**

**Jefe de enseñanza**

# **Análisis Comparativo del Proteóma del Angulo Iridocorneal en Pacientes con Glaucoma Primario de Angulo Abierto y Glaucoma Primario de Angulo Cerrado**

Departamento de Investigación y Proteómica  
Departamento de Glaucoma

Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”  
I. A. P.

INVESTIGADOR RESPONSABLE  
ANA PAOLA LOPEZ VENEGAS

TUTORES:

VICTOR MANUEL BUATISTA DE LUCIO  
MIRIAM DIAZ SANCHEZ  
KARLA DUEÑAS ANGELES

FECHA DE PROBABLE INICIO Y TERMINO DE PROTOCOLO  
Junio del 2013- Agosto del 2013

## INDICE

1) INTRODUCCIÓN.....	(2-5)
2) JUSTIFICACIÓN.....	(5)
3) HIPÓTESIS.....	(6)
4) OBJETIVO.....	(6)
5) DISEÑO DEL ESTUDIO.....	(6)
6) MATERIAL Y MÉTODOS.....	(6)
a) Criterios de Inclusión.....	(6)
b) Criterios de Exclusión.....	(6)
c) Tamaño de la Muestra.....	(7)
d) Variables del estudio.....	(7)
e) Metodología	
i) Técnica quirúrgica de trabeculectomía de GPAA y GPAC.....	(7)
ii) Procesado de la muestra.....	(7)
(1) Cuantificación de Proteínas de muestras .....	(8)
(2) Purificación de proteínas totales.....	(8)
(3) Isoelectroenfoque (IEE).....	(8)
(4) Electroforesis Bidimensional.....	(8)
(5) Tinción con azul de Coomassie.....	(9)
(6) Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	(9)
7) ANALISIS ESTADISTICO.....	(10)
8) CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	(10)
9) RESULTADOS.....	(11)
10)ANEXO DE ETICA.....	(17)
11)BIBLIOGRAFIA.....	(18)

## INTRODUCCIÓN

El Glaucoma es una neuropatía óptica crónica, progresiva e irreversible con pérdida de células ganglionares y fibras nerviosas, acompañada de cambios estructurales característicos del nervio óptico. (1)

El glaucoma representa la primera causa de ceguera irreversible en el mundo. (1,2) la Organización Mundial de la Salud consideró que 12.3% (4.5 millones) de personas ciegas en el mundo tuvieron como causa el glaucoma en el año 2002. (1) Por otro lado, a través de una estimación proveniente de la información publicada de prevalencia, se proyectó que para el año 2020 podría haber 79.6 millones de personas afectadas por glaucoma (74% con glaucoma de ángulo abierto) y con ceguera bilateral en 5.9 millones de personas con glaucoma de ángulo abierto y 5.3 millones con glaucoma de ángulo cerrado. (2) Existen por lo menos tres evidencias epidemiológicas que por su rigor metodológico, se ha obtenido la mejor información al respecto de la prevalencia del glaucoma. El Proyecto VER, Quigley y co-investigadores (3) reportan los resultados de examinar a 4774 mexicanos o mexicano-americanos en el estado de Arizona, Estados Unidos, encontrándose una prevalencia de 1.97% (IC 95%, 1.58%-2.36%) de glaucoma de ángulo abierto, incrementándose de 0.50% en los del rango de edad de 41 a 49 años hasta 12.63% en los mayores de 80 años; la prevalencia de glaucoma de ángulo cerrado fue de 0.10%. En contraste, el estudio LALES (the Los Angeles Latino Eye Study) demostró que la prevalencia de glaucoma de ángulo abierto en latinos fue de 4.74% (IC 95%, 4.22-5.30%) y también tenía un crecimiento exponencial relacionado a la edad que rebasaba 20% en los mayores de 80 años de edad. De manera interesante, 75% de los identificados con glaucoma no se sabía portadores del padecimiento (4).

Existen diversos factores predisponentes para el desarrollo del glaucoma de ángulo abierto (GPAA), de los cuales el factor hereditario y el aumento de la presión intraocular son los mas importantes, siendo este ultimo el principal factor de riesgo para la aparición y la progresión de la enfermedad y hasta el momento el único

modificable (6).

Es esencial conocer la dinámica del humor acuoso para el estudio y el tratamiento del glaucoma. La ecuación de Goldman resume la dinámica del humor acuoso y su relación con la presión intraocular:  $P=(F/C) + PV$ , donde P es la PIO en milímetros de mercurio (mmHg), F es la tasa de formación de humor acuoso en microlitros por minuto (ML/min), C es la facilidad de salida en ML/min/mmHg y PV es la presión venosa episcleral en milímetros de mercurio. Los pacientes con glaucoma y aumento de la PIO presentan una reducción en la facilidad de drenaje, por disfunción de los tejidos que la conforman, principalmente a nivel de la malla trabecular (7).

La patogénesis de GPAA todavía está poco clara. Diversas alteraciones que incluyen la esclerosis de la malla trabecular así como cambios en la composición molecular del humor acuoso parecen jugar un papel clave (10).

En el GPAA el daño o muerte de las células de la malla trabecular han sido implicadas en la patogénesis del glaucoma de Angulo abierto. Las células endoteliales de la malla trabecular mantienen su estructura y la facilidad de salida del humor acuoso del ojo por remodelación de sus poros y previenen que detritus ocluyan la vía de drenaje del humor acuoso (8).

Dentro de la malla trabecular de pacientes con glaucoma el número de células endoteliales esta disminuido y hay aumento del grosor de la membrana basal lo que sugiere un aumento de la actividad celular. Placas de material que parecen estar derivadas de fibras de tejido elástico aparecen en los haces corneoesclerales y en la malla yuxtacanalicular. El incremento del grosor de la vaina de las fibras elásticas y fibrillas conectadas reducen los espacios intratrabeculares y estrechan las vías de flujo dentro de las paredes endoteliales. La presencia de estas placas elásticas también incrementa con la edad pero la cantidad total de este material es mayor en los ojos de pacientes con GPAA.

Alteraciones de los componentes de la matriz extracelular, que son producidos y mantenidos por las células de la malla trabecular también han sido encontrados. Las

anormalidades del colágeno en el GPAA incluyen fragmentación, orientación alterada y espaciado anormal. La fibronectina es depositada en la región subendotelial del canal de Schelem. La expresión de miocilina y la cantidad de aB cristalina una pequeña proteína de estrés esta incrementada en la malla trabecular de algunos ojos glaucomatosos. La interacción de los componentes de la matriz extracelular con otras proteínas como coclina pueden conducir a la formación de depósitos que obstruyan la vía de drenaje.

En la malla trabecular la adhesión matriz-célula es crucial para el mantenimiento de la vía de salida. A corto plazo estudios experimentales que causan la perdida de contacto de las células de la malla trabecular con los haces conduce a un fuerte incremento en el flujo de salida. A largo plazo los haces desnudos de células típicos de los ojos glaucomatosos tienden a colapsar el uno con el otro, bloqueando los canales de salida (6).

En estudios recientes se ha mencionado que la inhibición de la señalización de Rho conduce a una elevación en la facilidad de salida mientras que la inducción de la señalización de Rho conduce al incremento de la resistencia de salida. Shiri Diskin y col sugieren una nueva función para Gal8 en la activación de la señalización de Rho y la regulación del citoesqueleto de la célula de la malla trabecular (11).

Las mutaciones en MYOC reducen la cantidad de miocilina normal que es secretada dentro del humor acuoso. Por otro lado la miocilina mutante que se acumula en el espacio intracelular puede ser toxica para las células de la malla trabecular iniciando una cascada de eventos que inician con la perdida de la función de estas células ocasionando alteraciones en la vía de salida del humor acuoso y resultando en una presión intraocular elevada (9).

También ha sido reportado que el factor de crecimiento transformador B-2 (TGFB2) (13), y el inhibidor del activador del plasminogeno-1 están elevados en el humor acuoso de pacientes con GPAA (12). Copine-1 se ha encontrado regulada a la alza en las membranas de las células de la malla trabecular y se ha sugerido en otros estudios que juega un rol importante en el crecimiento, exocitosis, apoptosis, transcripción genética y organización del citoesqueleto y defensa (14).



Diversos cambios complejos dentro de la malla trabecular contribuyen al aumento de la resistencia de drenaje en ojos glaucomatosos (6). Todas estas alteraciones causan anomalías microscópicas que por otra manera tienen una apariencia normal en el ángulo iridocorneal especialmente en la malla trabecular.

El GPAC por una consecuente elevación de la presión intraocular causada por una obstrucción del flujo de salida del humor acuoso o cambios degenerativos en la malla trabecular que son resultados del contacto iridotrabecular siendo este el evento primario ocurriendo como resultado de una desproporción del segmento anterior. En todos los casos de GPAC el control de la PIO es el objetivo primario con el objeto de salvaguardar la función visual de la neuropatía óptica glaucomatosa. No hay ningún estudio que analice la expresión proteómica en los pacientes con GPAC (6).

Siendo un problema de salud pública, poco reconocido, es importante mejorar el diagnóstico y los abordajes terapéuticos del GPAA y el GPAC siendo el entendimiento de los mecanismos complejos que regulan la circulación del humor acuoso esenciales para un mejor tratamiento del glaucoma de ángulo abierto.

## **JUSTIFICACION**

El glaucoma representa la primera causa de ceguera irreversible en el mundo, para el año 2020 podría haber 79.6 millones de personas afectadas por glaucoma (74% con glaucoma de ángulo abierto) y con ceguera bilateral en 5.9 millones de personas con glaucoma de ángulo abierto, y 5.3 millones con glaucoma de ángulo cerrado. En ambos casos teniendo como principal factor de riesgo para la aparición y la progresión el aumento de la presión intraocular el cual es el único modificable hasta el momento. Siendo el aumento de la resistencia de salida del humor acuoso a través de la malla trabecular de suma importancia en el aumento de la presión intraocular. De tal manera el GPAA y GPAC representa un problema de salud pública poco reconocido en donde el entendimiento de los mecanismos complejos que regulan la circulación del humor acuoso, en especial la resistencia en la salida a través de la malla trabecular son de suma importancia para mejorar el diagnóstico y sobre todo el tratamiento del GPAA y GPAC. No hay ningún estudio disponible que

analice la expresión diferencial de proteínas del ángulo iridocorneal del GPAA y del GPAC.

## **HIPOTESIS**

Existen diferencias en la composición proteica del ángulo iridocorneal de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto respecto a pacientes con glaucoma primario de ángulo cerrado que son resultado de los diferentes mecanismos etiopatogénicos, pero que en ambos casos ocasionan cambios microscópicos en su arquitectura y que determinan un aumento en la resistencia al flujo de salida del humor acuoso con una subsecuente elevación de la presión intraocular.

## **OBJETIVOS GENERAL:**

- Identificar diferencias en la composición proteica del ángulo iridocorneal de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto con respecto a pacientes con glaucoma primario de ángulo cerrado

## **DISEÑO DEL ESTUDIO:**

Transversal, descriptivo

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Pacientes con glaucoma de Angulo Abierto y Angulo Cerrado**

#### *Criterios de inclusión:*

- Pacientes con GPAA y GPAC que para el tratamiento de su enfermedad y para alcanzar presión intraocular meta deban ser sometidos a trabeculectomía

#### *Criterios de exclusión:*

- Pacientes con glaucoma de ángulo abierto secundario a otras patologías como esteroides, trauma, glaucoma secundario a pseudoexfoliación, glaucoma secundario a uveítis o glaucoma pigmentario entre otros.
- Pacientes con glaucoma de ángulo cerrado secundario a otras patologías como glaucoma neovascular, trauma, secundario a uveítis, etc.

## **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

- 10 PACIENTES CON GPAA
- 10 PACIENTES CON GPAC

## **VARIABLES DEL ESTUDIO**

Expresión relativa de las proteínas

## **METODOLOGIA**

**Técnica quirúrgica de trabeculectomía del ángulo iridocorneal en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma primario de ángulo cerrado.**

La técnica de obtención del tejido del ángulo iridocorneal se realizara de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma primario de ángulo cerrado que sean sometidos a trabeculectomía para alcanzar presión intraocular meta. Después de realizar asepsia y antisepsia, así como la colocación de campos estériles y blefaróstato, se coloca rienda corneal con Vickryl 8-0, se realiza peritomía base limbo de 5mm, se disecciona conjuntiva y tenon se escarifica y cauteriza, se realiza flap escleral de 2.5mm hasta llegar a limbo quirúrgico, se realiza paracentesis con cuchilleta de 15°, se penetra a cámara anterior con cuchilleta de 15° en el sitio del flap escleral, se realiza trabeculectomía con escleropunch para la obtención de 1-2mm de ángulo iridocorneal, posterior iridectomía y cierre de flap y conjuntiva con nylon 10-0. El tejido obtenido de trabeculectomía se colocara en solución salina balanceada y se preservara a -20 C

### **Procesado de la muestra**

Las muestras de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y de pacientes con glaucoma primario de ángulo cerrado, por grupos separados se homogenizaran en un buffer de lisis (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 137mM NaCl, 10% glicerol, 2mM de ácido etilenodiaminotetracético, 1 mM de ortovanadato, 10µg/ml aprotinina,

10µg/mL de leupeptina en agua) por 3 horas, en movimiento de 2° a 8°. Después de vortexear las muestras, se separaron los sobrenadantes por centrifugación (14 000 rpm, 30 minutos, 4°C) y posteriormente se almacenaron a -20°C y se cuantificaron usando el arreglo de proteínas (Bio-Rad).

#### 1) Cuantificación de Proteínas de muestras

Para realizar la cuantificación de proteínas en las muestras de trabeculectomías se utilizara el Kit de Biorad Protein Assay de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### 2) Purificación de proteínas totales

Para la purificación de las muestras se utilizara el kit Ready prep 2-D cleanup como lo indica e fabricante, se calcula de acuerdo al volumen de la muestra obtener 100 Microgramos de la mezcla de proteínas

#### 3) Isoelectroenfoque (IEE)

Se utilizarán las tiras IPG de 7 cm como escala de pH de 3 a 10. Para la rehidratación, las proteínas se diluyeron en un regulador que contiene 7 M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 0.5% ANFOLITOS, 50 mM DTT y 0.004% de azul de bromofenol (regulador de Rehidratación Ready Prep®, BioRad). Se cargaron las proteínas sobre la charola de corrimiento, se retiro la protección de las tiras IPG y se colocaron sobre cada carril, se utilizará el método de hidratación activa por al menos 16 hrs. Las tiras rehidratadas fueron enfocadas a 20 C utilizando el equipo IEF de Biorad, utilizando el siguiente protocolo: 100 V/1 hora/lineal, rehidratación activa 50 V/20°C/10 horas, 4000 V/lineal/2 horas, 4000 V/lineal/20000 V/h y 500 V/10 horas. Las tiras ya enfocadas se analizaron por electroforesis de doble dimensión en gel de poliacrilamida al 12%.

#### 4) Electroforesis Bidimensional

Las tiras se colocarán a temperatura ambiente y se equilibraron durante 10 min; el regulador de equilibrio continen 6 M urea, 2 M tiourea, 50 mM Tris, 34.5% glicerol, 2% SDS y 0.005% azul de bromofenol con 2% DTT, para el paso de reducción de las proteínas y 2.5% iodoacetamida remplazando al DTT para el segundo paso de

alquilación de las proteínas. La urea y la tiourea son agentes neutrales de desnaturalizan las proteínas. El CHAMPS es un detergente que favorece la solubilización de las muestras y previene la agregación de las proteínas y el DTT es un agente reductor que mantiene la proteína en estado reducido. Esta mezcla de compuestos es necesaria para mantener a las proteínas completamente desnaturalizadas, solubilizadas y disgregadas para favorecer la migración de las mismas en la electroforesis. La iodocetamida además de alquilar el exceso de DTT, alquila los grupos til de las proteínas evitando su reoxidación durante la electroforesis (Acin, 2005-2007).

Las tiras se colocarán en la parte superior del gel de poliacrilamida al 12 %, que contenía SDS, la presencia de este detergente forma un complejo SDS-proteína con carga negativa, permitiendo que la proteína migre en función de su tamaño aparte de SDS, los geles contenían una mezcla de polímeros de aparte de SDS, los geles contenían una mezcla de polímeros de acrilamida/bisacrilamida y regulador Tris-HCL a pH 8.8, para iniciar la polimerización se utilizo APS junto el catalizador TEMED. Para permitir que la tira y el gel estuvieran en contacto, se coloca aproximadamente 1 ml de agarosa al 0.5%

Se realizará la electroforesis a 120 V durante 2 hrs. Las muestras control y experimentales se corrieron en paralelo para minimizar variaciones.

#### 5) Tinción con azul de Coomassie

La Tinción de los geles de policrilamida de la segunda dimensión se realizará en una solución de azul de Coomassie/metanol/acido acético manteniendo en movimiento hasta que los geles se tiñeron en su totalidad, esta técnica permite observar hasta 0.1 mc de proteína como bandas diferenciadas (Berg y Tymoczko, 2008). Los geles se destiñeron con una solución de acido acético 7% metanol 15%.

#### 6) Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Después de la separación de las proteínas del ángulo iridocorneal en la electroforesis doble dimensión, se seleccionarán los puntos de las proteínas que

mostraron una expresión diferencial y se identificarán utilizando espectrometría de masas MALDI.TOF MS (Matrix- Assisted Lasser Desorptin/Ionización Time Of Flight Mass Spectrometry).

### **ANALISIS ESTADISTICO**

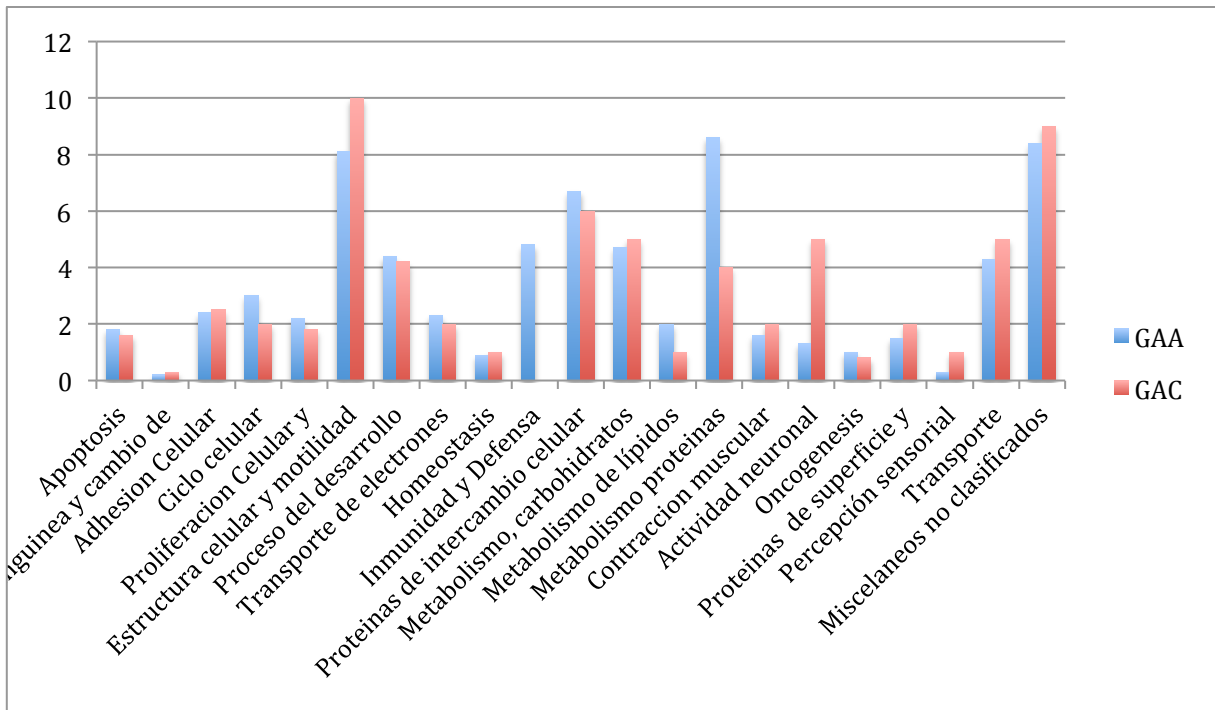
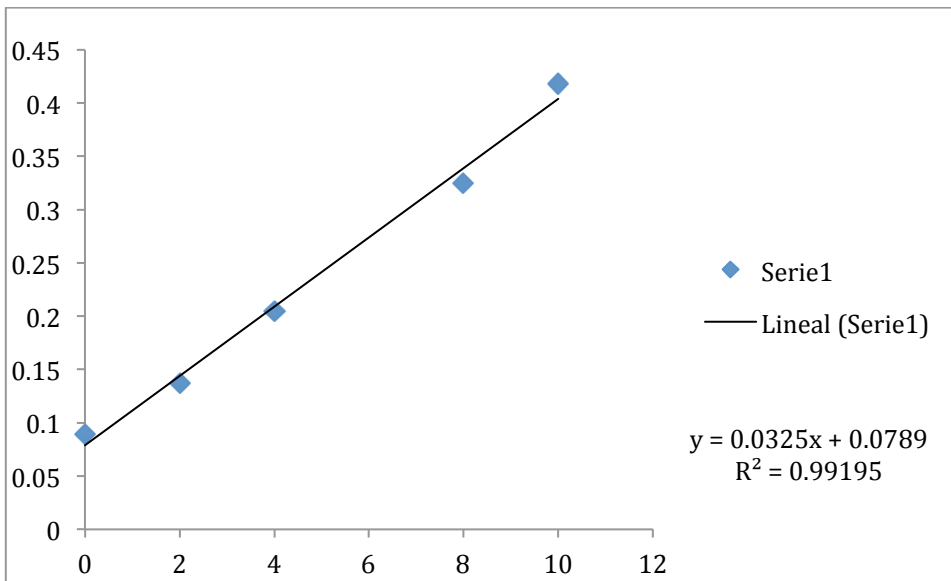
Prueba de t de Student

### **CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

<b>RECOLECCION DE MUESTRAS</b>	<b>PROCESAMIENTO DE MUESTRAS</b>	<b>RECOLECCION DE RESULTADOS</b>	<b>INTERPRETACION DE RESULTADOS</b>
Junio	Junio	Julio	Julio

## RESULTADOS.

Curva patrón que muestra el análisis de proteína total



## ÉTICA

### ANEXO DE CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se esta llevando a cabo en el Instituto de Oftalmología un protocolo de investigación acerca de las causas del Glaucoma Primario de Angulo Abierto y Glaucoma Primario de Angulo Cerrado muchas de las cuales hasta el momento se desconocen, el protocolo consiste en analizar las proteínas del ángulo iridocorneal del GPAA y compararlas con las del GPAC. Se le invita a usted a participar donando el tejido de la esclerectomía que normalmente se realiza durante la cirugía convencional a la que usted se someterá. Es importante recalcar que normalmente ese tejido es desechado. El beneficio que obtenida es principalmente la contribución a la ciencia. Los riesgos son los mismos que el de cualquier trabeculectomía sin añadir otros

Procedimiento: el día de la cirugía se tomara el tejido de la esclerectomía retirada durante el procedimiento de trabeculectomía al cual se someterá y se congelara para su posterior análisis, su nombre se mantendrá en el anonimato  
Cualquier duda o aclaración puede comunicarse con los responsables de la investigación

Dra. Ana Paola López Venegas. Residente de 3er año del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana I.A.P.” Actualmente en Rotación Depto. de Estrabismo

Dr. “Víctor Manuel Bautista de Lucio. Investigador Titular del departamento de Microbiología y Proteómica ocular en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana I.A.P.”  
Extensión 3212

---

Nombre y Firma del Participante



## BIBLIOGRAFIA

1. Resnikoff S, Pascolini D, Etyaále D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002 Bull World Health Organ 2004; 82; 844-851.
2. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. Br J Ophthalmol 2006; 90: 262-267.
3. Quigley HA, West SK, Rodriguez J, Munoz B, Klein R, Snyder R. The prevalence of glaucoma in a population-based study of Hispanic subjects: Proyecto VER. Arch Ophthalmol 2001 ; 119: 1819-1826.
4. Varma R, Ying-Lai M, Francis BA, et al. Prevalence of open-angle glaucoma and ocular hypertension in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. Ophthalmology 2004; 111: 1439-1448.
5. Young H. Kwon, M.D. et al, Mecanismos of disease of Primary Open-Angle Glaucoma, New England Journal of Medicine, 2009;360:1113-24.
6. Shaarawy, et al; Glaucoma. Medical Diagnosis and Therapy; Elsevier; 2010, USA, Volumen 1
7. Presion Intraocular y dinámica del Humor Acuoso En: Glaucoma, Seccion 10, American Academy of Ophthalmology. ELSERVIER 2005
8. Lütjen-Drecoll E, Rohen JW. Morphology of aqueous outflow pathways in normal and glaucomatous eyes. In: Ritch R, Shields MB, Krupin T, eds. The glaucomas. 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1996:89-123.
9. Young H. Et al, Mechanism of Disease Primary Open-Glaucoma, N Engl J Med 2009;360:1113-24.
10. Pieragostino D et al., Shotgun proteomics reveals specific modulated protein patterns in tears of patients with primary open angle glaucoma naïve to therapy. Mol Biosyst. 2013 Apr 12.
11. Shiri Diskin, et al., The role of integrin glycosylation in galectin-8-mediated trabecular meshwork cell adhesion and spreading, Glycobiology 2009 January; 19(1): 29-37
12. Xiaoming Duan, et al., Proteomic analysis of aqueous humor from patients with primary open angle glaucoma. Molecular Vision 2010; 16: 2839-2846
13. Kathryn E. Et al., Quantitative Proteomics: TGFB2 Signaling in Trabecular Meshwork Cells, IOVS, October 2011, Vol. 52, No. 11

14. Yuehong Zhang, et al., Upregulation of Copine 1 in trabecular meshwork cells of POAG patients: a membrane proteomics approach., *Molecular Vision* 2008; 14: 1028-1036