



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE
DE VALENCIANA I.A.P**

**“ASOCIACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA MICROBIOTA
DE LA SUPERFICIE OCULAR Y ADAPTACIONES
METABÓLICAS MICROBIANAS EN PACIENTES CON
PTERIGIÓN DE UN CENTRO OFTALMOLÓGICO DE
TERCER NIVEL EN LA CIUDAD DE MÉXICO”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD
EN OFTALMOLOGÍA**

PRESENTA

Dra. Lucero Ramírez Barajas

TUTOR DE TESIS

Dr. Victor Manuel Bautista de Lucio

Ciudad de México, Febrero 2020





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 Graue Wiechers
Profesor titular del curso

Sobre el curso de l.

Dr. Victor Manuel Bautista de Lucio
Director de Tesis

[Handwritten Signature]

Dr. Alejandro Navas Pérez
Jefe de Enseñanza


Instituto de Oftalmología
Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP S.C.
Jefatura de Enseñanza
Chimalpopoca 14, Colonia Obrera
Ciudad de México

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	9
MATERIAL Y MÉTODOS	9
1. Estandarización de procesos para realizar secuenciación masiva de muestras de superficie ocular	9
1. 1. Estandarización de homogenización, extracción y purificación de DNA de superficie ocular.....	10
a) Homogenización, extracción y purificación de DNA de raspado conjuntival por kit QIAGEN QIAmp Mini DNA kit	11
b) Homogenización, extracción y purificación de DNA con kit Innuprep DNA microkit Analitik Jena	12
c) Homogenización, extracción y purificación de DNA con kit Innuprep DNA/RNA minikit Analitik Jena	13
1.2. Estandarización de toma de muestra y elección del material de muestreo por rendimiento y calidad del DNA	13
1.3 Evaluación de especies dominantes en pterigión primario y sus adaptaciones metabólicas al microambiente.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
2. Resultados de estandarización de procesos	17
2.1 Resultados de Homogenización, extracción y purificación de DNA con kit Innuprep DNA/RNA minikit Analitik Jena.....	18

2.2 Resultados de la estandarización de toma de muestra y elección del material de muestreo por rendimiento y calidad del DN.....	20
a) Espectrofotometría por Nanodrop 2000	20
b) Evaluación de curvas de amplificación por PCR RT con primers específicos para 16 S para células bacterianas y PGK-1 (fosfogliceratocinasa-1).....	20
c) Evaluación de integridad y confirmación de amplicones correspondientes a primers específicos por electroforesis en geles de agarosa	21
2.3 Evaluación de especies dominantes en pterigión primario y sus adaptaciones metabólicas al microambiente	22
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
APÉNDICES	32
CESIÓN DE DERECHOS	38

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Patricia Barajas y Ernesto Ramírez y a mi hermano Miguel Ramírez, porque cada logro mío es un triunfo nuestro que no sería posible sin su cariño, empatía, apoyo y ejemplo. Este proyecto es la culminación de una de las etapas más importantes en mi desarrollo profesional y humano por eso les dedico mi trabajo como un homenaje a su amor y paciencia en cada paso de este largo camino.

Al Dr. Victor Manuel Bautista de Lucio que me ayudó en cada paso del camino del desarrollo de este proyecto y que compartió con dedicación y amabilidad su gran conocimiento y calidad humana en todo momento.

A Sebastián Diener Kudisch Gracias por darle significado a “siempre” y “para todo”.

A mis amigos oftalmólogos, porque en su amistad y en nuestras experiencias compartidas encontré los mejores momentos de mi residencia médica y un sentimiento de pertenencia y autenticidad solo equiparable a su enorme calidad humana e inmenso talento como profesionistas. Esta tesis es un reflejo de los pasos que dimos juntos cada día para alcanzar un sueño común que ahora se materializa gracias a nuestro esfuerzo y dedicación.

ASOCIACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA MICROBIOTA DE LA SUPERFICIE OCULAR Y ADAPTACIONES METABÓLICAS MICROBIANAS EN PACIENTES CON PTERIGIÓN DE UN CENTRO OFTALMOLÓGICO DE TERCER NIVEL EN LA CIUDAD DE MÉXICO

INTRODUCCIÓN

La patología de la superficie ocular es uno de los principales motivos de consulta oftalmológica. Entre las entidades que componen este grupo de afecciones se encuentran la conjuntivitis viral, bacteriana y fúngica, el ojo seco y las neoformaciones y degeneraciones conjuntivales entre las que se encuentran los nevos conjuntivales, los carcinomas, la pingüecula y el pterigión.

El pterigión es una alteración inflamatoria y proliferativa del tejido del limbo esclerocorneal que crece desde la conjuntiva bulbar hacia la córnea en forma triangular, con su base localizada hacia la periferia y el ápex hacia la córnea (Saw et al, 1999).

Dicha patología se presenta en todo el mundo, con una mayor frecuencia en sitios con climas cálidos y secos. Clásicamente, la incidencia y prevalencia del pterigión se ha calculado de acuerdo a la latitud geográfica, por lo cual, por la ubicación de nuestro país entre 0° y 30° se esperaría una prevalencia entre 10 a 30% de la población (Aragón, et al, 2009, Ma Ke et al, 2007), sin embargo en un estudio realizado por Ruiz-Gonzalez y Nava-Castañeda en relación a la población que se presentó a consulta en el período 2004 a 2005 en nuestro centro la prevalencia fue de un 0.36%, poco cercano a la correlación de prevalencia-exposición a luz solar por ubicación geográfica.

Se han realizado varias investigaciones para identificar los factores de riesgo para el desarrollo del pterigión, encontrándose como principales la exposición a la luz UV y a climas cálidos y secos (Luthra et al, 2001). La prevalencia del pterigión

aumenta con la edad, con una mayor incidencia entre 20 y 49 años de edad, con alta tasa de recurrencia posterior a tratamiento quirúrgico (Chui et al, 2011).

Aún no existe un consenso sobre la etiología del pterigión, aunque su patogénesis se ha relacionado a varios factores entre los cuales se encuentran la exposición a radiación ultravioleta y climas secos, la participación de virus oncogénicos como el virus del herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y los subtipos 11 y 18 del virus del papiloma humano (Aikaterini, et al 2013, Bautista et al, 2014), cursando con expresión anormal de p53, pérdida de la heterocigocidad del DNA microsatélite y en los casos donde existe relación con virus del papiloma humano sobreexpresión de proteínas inhibidoras de apoptosis como cIAP-1, clusterina y XIAP (Bautista et al 2014, Detorakis et al 2001, Reid et al 2003).

El espectro de las manifestaciones clínicas del pterigión depende del grado de severidad de la invasión, siendo en algunos casos asintomático, mientras que también puede presentarse sensación persistente de cuerpo extraño, astigmatismo, epífora, fotofobia, diplopía por restricción de los movimientos oculares, ojo seco o déficit visual por invasión pupilar con obstrucción del eje visual (León et al, 2010), además de constituir un problema estético y de autoimagen para los pacientes que lo presentan, debido a que puede presentarse como una lesión grisácea, blanca, amarillenta o rojiza de aspecto exofítico sobre la conjuntiva.

Morfológicamente el pterigión consta de tres áreas: la cabeza, el cuerpo y el cuello. La cabeza es un área grisácea, plana y avascular situada en el ápex en cuyo borde anterior se aprecia una franja marrón, la línea de Stocker, constituida por depósitos de hemosiderina. El cuello conecta la cabeza y el cuerpo, que se

localiza en la conjuntiva bulbar, con vasos rectos y radiales respecto al ápex. La localización más frecuente es unipolar en el extremo nasal de la conjuntiva bulbar, seguida por localización unipolar temporal, presentándose en menor proporción casos de lesión bipolar con ambos extremos afectados en el mismo ojo. El pterigión puede ser unilateral o bilateral. (Coroneo et al, 1999)

Histológicamente el pterigión se ha clasificado en tres tipos: 1) angiomaso, en el cual el estroma contiene un importante número de canales vasculares con edema en el espacio intravascular; 2) fibroso en el cual el estroma presenta elastosis de forma predominante con pocos elementos vasculares; 3) mixto, que contiene ambos elementos (Ratnakar et al, 1976).

El epitelio que constituye al pterigión se forma a partir de una alteración focal del limbo esclerocorneal que cursa con proliferación de tejido conjuntivo elastótico con crecimiento de conjuntiva anormal sobre la córnea y subsecuente destrucción de la capa de Bowman, con actividad angiogénica, que cursa además con inflamación concomitante (Leibowitz et al 2000, Anguria et al 2014).

Dushku y cols. demostraron la expresión anormal de las metaloproteasas MMP-1, MMP-2 y MMP-9 en las células basales epiteliales del pterigión, responsables del daño al colágeno fibrilar de la capa de Bowman con subsecuente activación de fibroblastos alterados que depositan tejido fibroso sobre áreas de daño debido a estimulación inflamatoria de interleucinas y factor de necrosis tumoral. (Dushku et al , 2002). Se ha propuesto que existe un disparador inicial que activa las células epiteliales basales del limbo a producir citocinas proinflamatorias como la IL-6 e IL-8, lo cual activa una cascada de eventos que incluyen infiltración neutrofílica y linfocitaria con predominio de estirpe T, que contribuye al desarrollo de inflamación crónica, además de proliferación y activación de fibroblastos y miofibroblastos con la reducción de la apoptosis por acción de interferón α , con inducción de metaloproteasas y sus inhibidores tisulares (TIMPs), que genera afección del

índice de remodelamiento tisular e invasión centripeta de la córnea por el epitelio limbal por acción del factor de crecimiento de fibroblastos β (FGF β) y factor de crecimiento transformante β (TGF β) y marcada angiogénesis con precursores como el óxido nítrico (Ochoa-Tabares, 2006).

El origen de dicha respuesta inmunológica anormal aún permanece en estudio, siendo atribuida en gran parte a alteraciones relacionadas a la radiación UV, aunque no se ha encontrado una relación directa a ningún factor específico, ni se han realizado estudios que caractericen a las especies bacterianas que constituyen a la microbiota residente en la superficie ocular de pacientes con pterigión que puedan estar relacionadas a la inducción o regulación de este proceso.

La microbiota humana se establece posterior al nacimiento en un proceso dinámico que alcanza una composición homeostática que permanece estable durante la mayoría de la vida adulta y se relaciona a la regulación de diversos procesos metabólicos, fisiológicos e inmunológicos del hospedero (Barton et al, 2007, Scholtens et al, 2012) y que en su conjunto constituyen al microbioma; la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patogénicos que comparten el espacio corporal (Lederberg et al 2001), cuya caracterización en individuos sanos y enfermos busca establecer asociaciones entre su homeostasis, la inducción de tolerancia inmunológica y desequilibrio asociado a estados patológicos (Miller et al, 2009). Esta relación se evidenció en un estudio realizado por Berry y cols. en 2002, sobre el papel de las bacterias comensales en el metabolismo de la mucina de la película lagrimal, en el cual se demostró que los individuos con una superficie ocular sana en relación a usuarios de lentes de contacto sintomáticos y conjuntivas cadavéricas, tenían un mayor nivel de enzimas mucinolíticas derivadas de bacterias que funcionan para escindir mucinas unidas a la superficie epitelial, liberándolas a la película lagrimal, estas mucinas libres, reducen el crecimiento bacteriano ocular, generando una

retroalimentación que actúa para disminuir la carga bacteriana en la lágrima. Es posible establecer una relación entre la desregulación de las especies comensales habituales que puede irrumpir en este ciclo y potencialmente permitir el crecimiento bacteriano patógeno.

En el estudio realizado por Dong y cols. en 2011, se caracterizó a la microbiota residente de la superficie ocular normal por medio de secuenciación de ADN y 16S ARN, encontrándose 12 géneros principales (>96%) ubicuos entre los individuos de la muestra, constituidos por *Pseudomonas* (20%), *Propionibacterium* (20%), *Bradyrhizobium* (16%), *Corynebacterium* (15%), *Acinetobacter* (12%), *Brevundimonas* (5%), *Staphylococci* (4%), *Aquabacterium* (2%), *Sphingomonas* (1%), *Streptococci* (1%), *Streptophyta* (<1%) y *Methylobacterium* (<1%), además de otros 47 géneros variables entre los participantes (<4%), estableciendo una mayor diversidad y mayor prevalencia de bacterias Gram negativas (*Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Bradyrhizobium*) a la que previamente se había logrado conocer por medio de cultivos que presentaba predominio de bacterias Gram positivas (*Staphylococci*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococci*) (Miller et al, 2009). Considerando además, que gran número de estas bacterias se clasificaban como patógenas, encontrarlas en la superficie ocular normal establece nuevas perspectivas en el estudio de sus interacciones con la regulación inmunológica y su incremento, disminución o cambio en relación a diversas patologías infecciosas, no infecciosas o inflamatorias y proliferativas como el pterigión, en los que la alteración de mecanismos reguladores del ciclo celular y apoptosis, la respuesta inflamatoria concomitante y la alta tasa de recidiva pueden encontrarse relacionadas a un perfil de microbiota diferente al presente en la superficie ocular normal.

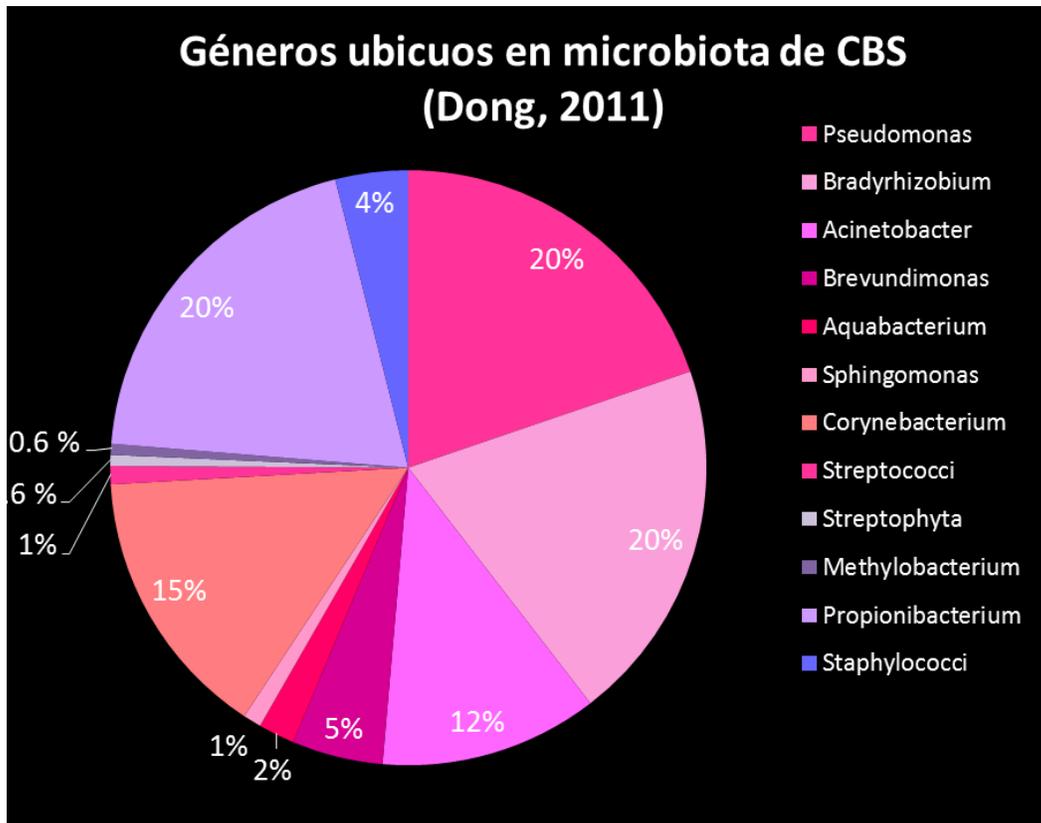


Figura 1.1 microbiota residente de la superficie ocular normal por medio de secuenciación de ADN y 16S ARN

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la microbiota cultivable de la superficie ocular de pacientes con pterigiión y analizar sus diferencias metabólicas con respecto a los controles sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Estandarización de procesos para realizar secuenciación masiva de muestras de superficie ocular

1.1 Estandarización de homogenización, extracción y purificación de DNA de superficie ocular

Las muestras de superficie ocular contienen escaso DNA, por lo cual es necesario encontrar una técnica capaz de recuperar la mayor cantidad de DNA disponible con la mayor pureza e integridad posible. Para ello se emplearon diferentes técnicas y métodos de evaluación de las mismas que se describen a continuación. Los resultados detallados de este proceso se presentarán en el siguiente apartado sólo para la técnica de elección(c) y la elección de materiales. El resto se encuentra disponible en la bitácora en extenso de este proyecto.

a) Homogenización, extracción y purificación de DNA de raspado conjuntival por kit QIAGEN QIAmp Mini DNA kit (Hilden, Alemania)

Para probar este kit se utilizaron un total de 6 muestras de raspado conjuntival: de pterigión (4) y superficie ocular normal (2) de voluntarios con consentimiento informado previo, en 3 ocasiones distintas procesadas en los 30 minutos posteriores al muestreo de acuerdo con lo indicado por el fabricante. Debido a que la cantidad de DNA obtenida con este kit y su calidad eran menores a lo óptimo para la secuenciación masiva, se decidió optar por probar otro kit con mejor rendimiento para cantidades pequeñas de DNA.

b) Homogenización, extracción y purificación de DNA con kit Innuprep DNA microkit Analytik Jena (Jena, Alemania)

Para probar este kit se utilizaron un total de 6 muestras de raspado conjuntival de pterigión (5) y superficie ocular normal (1) y 4 muestras histopatológicas de pterigión de voluntario con consentimiento informado previo, en 2 ocasiones

distintas procesadas en los 30 minutos posteriores al muestreo de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante. Para mejorar el rendimiento según lo reportado por otros investigadores, se realizó una variación en el último paso en el cual el buffer de elución se calentó a 70°C y se dejó incubar con la columna de silicón por 5 minutos previo a centrifugado final. Con este proceso el DNA obtenido fue íntegro y en cantidad adecuada para la secuenciación masiva, sin embargo las relaciones 260-280 nm y 230-260 nm mostraban un grado de pureza inferior al esperado por lo cual fue necesario probar otro método con mejores resultados de purificación y similares rendimientos de DNA.

c) Homogenización, extracción y purificación de DNA con kit Innuprep DNA/RNA minikit Analytik Jena (Jena, Alemania)

Para probar este kit se utilizaron un total de 5 muestras de raspado conjuntival de pterigión (4) y superficie ocular normal (1) y 6 muestras histopatológicas de pterigión de paciente voluntario con consentimiento informado previo, en 2 ocasiones distintas procesadas en los 30 minutos posteriores al muestreo de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante. Debido a que la cantidad, pureza e integridad del DNA fueron adecuadas con este proceso, no se realizaron modificaciones y se eligió como el método de extracción que se utilizará para la secuenciación masiva de muestras de pacientes participantes en este proyecto. Con este método también se realizó la evaluación, estandarización y optimización de toma de muestra con diversos materiales como se menciona en el apartado 1.2.

1.2 Estandarización de toma de muestra y elección del material de muestreo por rendimiento y calidad del DNA

En la literatura existen reportes de utilización de diversos materiales para el muestreo de superficie ocular y microbioma. La mayoría de los autores han utilizado raspados conjuntivales con hisopos estériles con alginato de calcio, sin embargo, De Paiva (2016) y Berry (2002) reportan adecuada toma de muestra, calidad y cantidad de DNA con membranas de impronta conjuntival, por lo cual en colaboración con el departamento de Córnea y el laboratorio de Biología celular y membrana amniótica del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP” con previo consentimiento informado del procedimiento por parte del paciente, se realizó muestreo y se compararon los siguientes materiales y métodos:

1. Muestra histopatológica de cabeza de pterigión obtenida posterior a resección quirúrgica. El tejido se depositó inmediato a su escisión en 500 μ l de PBS 1x estéril y se congeló a -80° C hasta su procesamiento.
2. Raspado conjuntival horizontal de pterigión y conjuntiva bulbar con presión moderada en tres ocasiones secuenciales con hisopo de alginato de calcio colocado posteriormente en PBS 1x estéril y congelado a -80° C hasta su procesamiento.
3. Impronta conjuntival con las siguientes membranas:
 - 3.1 Membranas Millipore PET (Ptereftalato de polietileno. 0.4 μ m, Darmstadt, Alemania)

3.2 Membranas Millipore Biopore PTFE (Politetrafluoroetileno hidrofílico. 0.4 μm , Darmstadt, Alemania)

3.3 Membranas de Nitrocelulosa Bio-Rad, (Estados Unidos, estériles de 5 mm de diámetro), fabricadas y esterilizadas específicamente para el muestreo de este proyecto.

Posterior a toma de muestra de impronta conjuntival las membranas fueron desmontadas de su soporte con pinzas estériles, colocadas en 500 μl de búffer de lisis celular RL (Jena, Alemania) y congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

Para determinar el método más adecuado para la toma de muestra se tomaron los siguientes parámetros de evaluación posterior a homogenización, extracción y purificación de DNA por medio del kit Innuprep DNA/RNA minikit Analytik Jena (Jena, Alemania):

A. Análisis cuantitativo por espectrofotometría con Nanodrop 2000 de:

- 1) Cantidad de DNA recuperado ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
- 2) Pureza (relaciones 260-280 nm y 260-230 nm) del DNA.

B. Curvas de amplificación y análisis de Ct y Melt de DNA extraído por PCR RT con primers específicos para 16 S para células bacterianas y PGK-1 (fosfogliceratocinasa-1) para células eucariontes y comparación de abundancia entre ellas, para descartar exceso de celularidad humana con las siguientes condiciones:

Reactivo	Vol. de reactivo para reacción de PGK 1 (µl)	Vol. de reactivo para reacción de 16S (µl)
Taq	5.0	7.5
Primer Forward	0.5	0.3
Primer Reverse	0.5	0.3
H ₂ O libre de DNAsas	2.0	0.3
Cyto 9	1.0	1.0
DNA	1.0	3.9
Condiciones en termociclador Rotor Gene Q QIAGEN		

C. Evaluación de integridad y confirmación de amplicones correspondientes a primers específicos por electroforesis en geles de agarosa a 1x con 90 V y 500 mAmp por 45 minutos.

1.3 Evaluación de especies dominantes en pterigión primario y sus adaptaciones metabólicas al microambiente

Por cuestiones metodológicas en relación a la estandarización de procesos de muestreo, optimización de calidad de material de muestra así como selección y reclutamiento de pacientes con criterios de inclusión en la institución sede donde se ha reportado una prevalencia de 0.36% de los pacientes que acuden a los servicios de consulta externa (Ruiz-Gonzalez, Nava-Castañeda, 2006) , así como tiempo proyectado para los procesos de secuenciación masiva y análisis bioinformático, el periodo dado para completar la totalidad de este proyecto resultó insuficiente, por lo cual se realizó un método alternativo en la misma línea de investigación y que satisface en su totalidad el objetivo general de este proyecto

y genera las bases necesarias para la continuación de la parte final de este protocolo por parte del Departamento de Microbiología y Proteómica Ocular del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana”.

Para ello se obtuvieron muestras de película lagrimal de 20 pacientes con pterigión primario, bilateral o unilateral y conjuntiva bulbar sana contralateral por medio de impronta conjuntival con kits estériles realizados específicamente para el proyecto, consistentes en membranas de nitrocelulosa estériles de 5mm de diámetro, pinzas romas y tubos de infusión cerebro-corazón. Se explicó el procedimiento a los pacientes voluntarios y tres a cinco minutos previos se administró una gota de tetracaína tópica en cada ojo, posteriormente se colocó la membrana de nitrocelulosa sobre la superficie del pterigión o conjuntiva bulbar sana y se realizó arrastre mecánico suave en sentido externo en 3 ocasiones secuenciales, la membrana se depositó en infusión cerebro-corazón para su posterior incubación por 24 a 72 h a 37°C. Se sembró la muestra en agar chocolate y Saboraud, colocándose en incubadora a 37°C para agar chocolate y 28°C para agar Saboraud por períodos variables dependiendo del crecimiento observable. Se tomaron colonias aisladas de cada muestra y se realizaron tinciones de Gram para determinar la tarjeta adecuada de reacciones para identificación por el equipo: Gram positivas (GP), Gram negativas (GN) y levaduras (YST). Las diluciones para análisis se realizaron en 3ml de solución salina con las siguientes densidades, medidas por densidad óptica con el instrumento DensiCHECK (Biomériux):

<u>Tarjeta</u>	<u>Unidades McFarland (McF)</u>
<u>Bacterias Gram Negativas- GN</u>	0.5-0.63
<u>Bacterias Gram Positivas- GP</u>	0.5-0.63
<u>Neisseria, Haemophilus- NH</u>	2.70-3.30
<u>Anaerobios, Corynebacterias- ANC</u>	2.70-3.30
<u>Levaduras- YST</u>	1.80-2.20

Posteriormente se identificaron mediante el sistema VITEK 2C (Biomériux) y se realizó una comparación entre las pruebas bioquímicas entre los miembros de cada especie y su relación con el tejido del cual procedía cada cepa (Pterigión primario frente a conjuntiva bulbar sana) y las rutas metabólicas involucradas con dichas enzimas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.0 Resultados de estandarización de procesos

Las muestras se nombrarán de la siguiente manera:

Tipo de muestreo:

RC: Raspado conjuntival
PTER: Tejido de pterigión
PET: Membrana Millipore de Ptereftalato de polietileno
PTFE : Membranas Millipore de politetrafluoroetileno
NTC: Membranas de Nitrocelulosa estériles
SON: Superficie ocular normal
SOP: Superficie ocular con pterigión

Seguido por las iniciales del paciente de cual se tiene un resumen clínico y referencia al expediente institucional en la bitácora extensa de este proyecto.

P.e: RC/SOP/MNR- Raspado conjuntival de superficie ocular con pterigión paciente MNR

2.1 Resultados de Homogenización, extracción y purificación de DNA con kit Innuprep DNA/RNA minikit Analitik Jena (Jena, Alemania)

a) Espectrofotometría por Nanodrop 2000

Muestra	DNA obtenido (ng/ml)	Relación 260-280 mm	Relación 260-230 mm	Total de DNA (ng) en 40 µl de búffer AE
RC/SOP/ MMA	9.8	1.88	2.07	392
RC/SOP/TSA	9.5	1.79	2.11	380
RC/SOP/ RJG	16.4	1.98	2.22	656
RC/SOP/JLP	14.3	1.79	1.94	572
RC/SON/LRB	11.56	2.01	2.10	462
PTER/SOP/ MMA	16.1	1.99	2.26	644
PTER/SOP/TSA	13.6	1.97	2.34	544
PTER/SOP/ RLO	23.4	2.03	2.33	936
PTER/SOP/BJA	14.8	1.96	2.14	592

b) Evaluación de curvas de amplificación por PCR RT con primers específicos para 16 S para células bacterianas y PGK-1 (fosfogliceratocinasa-1)

Muestra	Ct	Melt		Ct	Melt	
	Primer 16S	Primer 16S		Primer PGK1	Primer PGK1	
		1	2		1	2
C+	21.2	87.8	-	-	78.0	-
C-	31.7	-	-	30.1	-	-
RC/SOP/ MMA	22.4	87.3	89.2	28.07	79.9	-
RC/SOP/TSA	23.7	89.1	90.5	29.11	76.2	78.1
RC/SOP/ RJG	16.4	87.5	-	30.4	81.3	-
RC/SOP/JLP	27.2	89.0	-	30.0	77.3	84.2
RC/SON/LRB	28.6	88.3	-	29.8	78.9	-
PTER/SOP/ MMA	28.0	88.4 90.7		25.1	80.6	-
PTER/SOP/TS A	29.5	89.5	-	24.3	77.4	79.6
PTER/SOP/ RLO	26.7	87.0 89.2		21.1	76.5	-
PTER/SOP/BJA	24.8	88.0	-	23.9	76.2	83.1

Con base en el análisis de estos parámetros y en comparación con la literatura, puede concluirse que a pesar de que la superficie ocular contiene escaso DNA, los rendimientos obtenidos son suficientes en cantidad y calidad para utilizarse en el secuenciador masivo Illumina Miseq que genera amplificación a partir de 1 ng/μl y que se obtuvieron exitosamente tanto células eucariotas como bacterianas, con un claro predominio de células eucariotas en las muestras histopatológicas de pterigión y bacterianas en las de superficie ocular, por lo cual se procedió a la evaluación de los métodos de toma de muestra como se menciona en el apartado 1.2, cuyos resultados se presentan a continuación.

2.2 Resultados de la estandarización de toma de muestra y elección del material de muestreo por rendimiento y calidad del DN

a) Espectrofotometría por Nanodrop 2000

Muestra	DNA obtenido (ng/ml)	Relación 260-280 nm	Relación 260-230 nm	Total de DNA (ng) en 40 µl de búffer AE
PTER/SOP/JMM	17.0	2.12	2.19	680
RC/SOP/HRL	12.1	1.99	2.09	484
PET/SOP/GNL	10.4	1.90	2.12	416
PFET/SOP/LCA	13.6	2.04	2.31	544
NTC/SOP/DAM	14.1	2.27	2.47	564

b) Evaluación de curvas de amplificación por PCR RT con primers específicos para 16 S para células bacterianas y PGK-1 (fosfogliceratocinasa-1)

Muestra	Ct Primer 16S	Melt Primer 16S		Ct Primer PGK1	Melt Primer PGK1	
		1	2		1	2
C+	21.2	87.8	-	-	78.0	-
C-	31.7	-	-	32.1	-	-
PTER/SOP/JM M	27.4	86.7	-	20.1	77.0	85.0
RC/SOP/HRL	23.9	86.8	-	29.11	78.0	86.2
PET/SOP/GNL	24.3	77.5 83.7	-	30.4	77.2	-
PFET/SOP/LCA	22.8	83.5 86.8	-	30.0	77.0	84.2
NTC/SOP/DAM	22.0	87.7	-	29.8	77.3	-

Al analizar los resultados previos puede concluirse que el muestreo más adecuado de DNA con una proporción aceptable de recuperación de células bacterianas y eucariotas se obtuvo con las membranas de impronta conjuntival de nitrocelulosa y politetrafluoroetileno que presentaron rendimientos superiores a los 10 ng/μl, Ct con amplificación temprana cercana al control positivo de 16 S (22.4 ± 4 ciclos) y relativamente baja para PGK-1 (29.9 ± 1 ciclo) constatando que la población de células bacterianas se encuentra en un rango de 1.33 ± 2 células bacterianas por cada célula humana contrario a lo observado en la muestra histopatológica de pterigión donde la relación de células bacterianas es de 0.73:1 célula humana. En relación a a las temperaturas Melt todas las muestras presentaron un rango de proximidad adecuada para los primers evaluados en cada caso aún en las que mostraron picos bifásicos por lo cual se confirma por este método la amplificación específica de dichos primers.

c) Evaluación de integridad y confirmación de amplicones correspondientes a primers específicos por electroforesis en geles de agarosa

Por este método se realizó confirmación de dichos parámetros, los geles de agarosa se presentarán en el apartado de apéndices.

2.3 Evaluación de especies dominantes en pterigión primario y sus adaptaciones metabólicas al microambiente

De nuestros 20 pacientes, 15 presentaron pterigión unilateral (75%) y 5 bilateral (25%). La edad media de fue de 50.95 años con un rango de 13 a 92 años. Un 65% de los pacientes fueron del sexo femenino y un 35% masculino. La procedencia de los pacientes se distribuyó de la siguiente manera: 4 de la Ciudad

de México (20%), 5 del Estado de México (25%), 4 de Chiapas (20%), 3 de Veracruz (15%) , 3 de Hidalgo (15%) y 1 de Puebla (5%).

Las muestras de impronta conjuntival de conjuntiva bulbar sana y pterigión presentaron adecuado crecimiento con la toma de muestra implementada. A partir del cultivo en infusión cerebro-corazón se lograron aislar una o varias colonias en los agares chocolate y Saboraud.

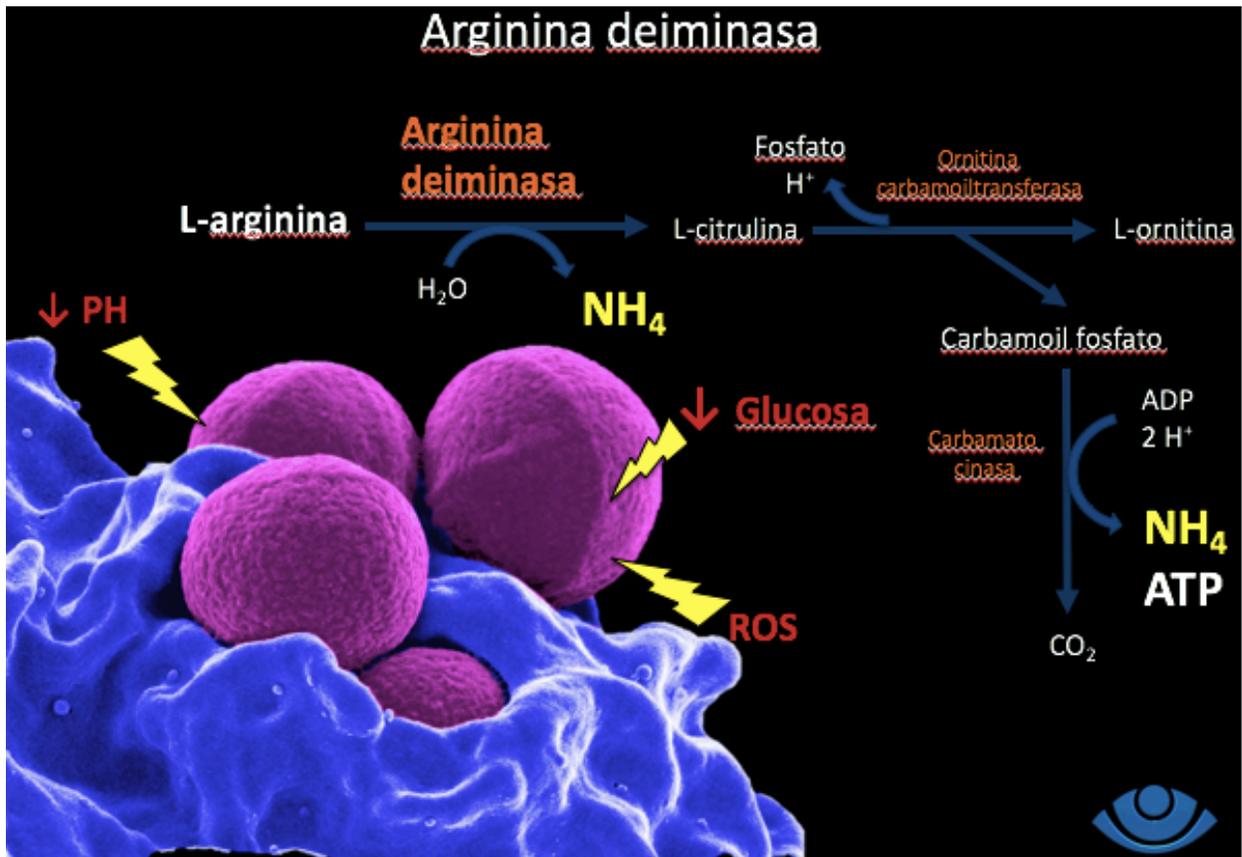
En las muestras provenientes de pterigión primario, *Staphylococcus epidermidis* fue la especie con mayor representatividad, presentándose en 65% de los aislados clínicos, seguido por *S. hominis* en un 35%. Cada una de la especies complementarias acontecieron en menos de 10% de las muestras, sin embargo mostraron un escenario diverso e incluyeron a *S. warneri*, *S. aureus*, *Leuconostoc mesenteroides* spp *mesenteroides*, *Streptococcus sanguinis*, *S. mitis*, *Rothia mucilaginosa*, *Gemella sanguinis* y las levaduras *Candida albicans* y *C. sphaerica*.

En las muestras de superficie ocular provenientes de conjuntiva bulbar sana *Staphylococcus epidermidis* se presentó en un 20%, seguido por *S. mitis* con un 7.5% de representatividad , el resto de las bacterias ocurrieron en menos de 5% y fueron *S. warneri*, *S. aureus*, *L. mesenteroides* spp *mesenteroides*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *Enterococcus columbae*, *Kocuria rosea*, *C. sphaerica* y *Rhodotorula glutinis*.

Un aspecto relevante fue algunos de los microorganismos caracterizados pertenecientes a la misma especie mostraron perfiles bioquímicos distintos entre los especímenes provenientes de la muestras de pterigión o conjuntiva bulbar sana, lo cual se correlaciona directamente con las enzimas que se encuentran activas en dichas cepas y puede estar relacionado a las diferencias entre el microambiente de estos tejidos.

A pesar de que la etiología del pterigión aún no es clara, el papel de la radiación UV continúa siendo preponderante ya que actúa directamente por fototoxicidad o indirectamente a través de radicales libres (RL) que generan cambios en el microambiente de la superficie ocular con pterigión. Intracelularmente, los RL generan daño oxidativo actuando sobre macromoléculas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, sin embargo su papel extracelular en relación al tejido conjuntival y sus especies residentes aún no había tenido un acercamiento. Los radicales libres, que consisten principalmente en moléculas como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), son escindidos por un sistema de enzimas antioxidantes. En 2011, Mehmet et al, estudiaron la actividad enzimática de la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) y los niveles de óxido nítrico (NO) y malon dialdehído (MDA) en un grupo de pacientes con y sin pterigión, encontrando que los niveles de actividad enzimática fueron significativamente más bajos en el grupo de pterigión en comparación con los controles mientras que en el mismo grupo se observó un aumento significativo en los niveles de NO y MDA un producto de la peroxidación de lípidos que se produce como resultado del estrés oxidativo. A su vez en 2013, Bautista et al realizaron un análisis proteómico que evidenció la sobreexpresión de peroxirredoxina 2, una enzima antioxidante, en el tejido de pterigión en comparación al tejido sano. Con estas y otras aportaciones se ha demostrado que el pH bajo y el microambiente oxidativo prevalecen en esta condición anormal de la conjuntiva bulbar, con lo cual la homeostasis de la microbiota ocular se altera y los microorganismos deben hallar vías alternas de protección para evitar la desnaturalización de sus componentes, procurar la obtención de energía, continuar la colonización del nicho en el cual se han establecido e intentar basificar el microambiente que las rodea. En nuestras muestras, la adenosina deiminasa fue la que presentó la diferencia más marcada

entre los integrantes del género *Staphylococcus*, siendo activa en un 18% de las cepas provenientes de muestras de conjuntiva bulbar sana frente a las de pterigión en las que se presentó en un 72%. El sistema de arginina deiminasa representa una vía metabólica de degradación de arginina que proporciona energía, CO₂ y nitrógeno en forma de amoníaco. Está ampliamente distribuido entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y su actividad se regula por estímulos ambientales, principalmente el ambiente anaeróbico y ácido, al activarse esta vía se cataliza la conversión de arginina en ornitina, produciendo así amoníaco, dióxido de carbono y un mol de ATP por mol de arginina, lo que promueve el crecimiento bacteriano, la producción de amoníaco que actúa como un regulador de pH y producción de ATP, esta vía también se ha encontrado activa en bacterias multidrogosresistentes y en condiciones de privación extrema de oxígeno y glucosa in vitro, evidenciándose su importancia como mecanismo de preservación y supervivencia bacteriana, explicándose con ello su expresión bioquímica en muestras provenientes de tejidos con un microambiente adverso como el de pterigión.



CONCLUSIONES

Los procesos de estandarización de toma de muestra, extracción y purificación de DNA con rendimientos aceptables en superficie ocular permitirán continuar con el proceso de secuenciación masiva y caracterización de microbiota en pacientes con pterigión.

Existen diferencias entre las especies que colonizan la superficie ocular en conjuntiva bulbar sana y pterigión primario, además de que existen diferencias metabólicas entre aislamientos de la misma especie asociados al tejido de los que proceden, lo que sugiere que las diferentes condiciones entre ambos microambientes pueden cambiar la biota residente y su adaptación, lo cual debe continuar en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Aikaterini K, Demetrios A, “Viral Involvement in the Pathogenesis and Clinical Features of Ophthalmic Pterygium (Review).” *International Journal of Molecular Medicine* 32.3 (2013): 539–543. PMC. Web. 24 July 2015.

Anguria P, Kitinya J, Ntuli S, Carmichael T. The role of heredity in pterygium development. *Int J Ophthalmol.* 2014 Jun 18;7(3):563-73. eCollection 2014. Review.

Aragones B, Alemany J, Relación de la radiación ultravioleta y el pterigión primario Relation of ultraviolet radiation and primary pterygium, *Revista Cubana de Oftalmología*, 2009;22(1)0

Barcelona-Andres, B.; Marina, A.; Rubio, V. Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2002, 184, 6289–6300.

Bautista V, Sámano-Hernández L, González-Márquez H, Ortiz-Casas M, Mejía-Lopez H, Garfias Y; Presence of Human Papilloma Virus in pterygium and its association with an apoptotic proteome profile.. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(13):2752.

Belda-Ferre et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 6 2012.

Chiu J, Minas T, Tat L, Crouch R, Wakefield D, Di Girolamo N, Ophthalmic Pterygium a Stem Cell Disorder with Premalignant Features, The American Journal of Pathology, Vol. 178, No. 2, February 2011.

Coroneo MT, Di Girolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. Curr Opin Ophthalmol 1999; 10:282-8.

Cusumano, Z. , Caparon M. Citrulline Protects Streptococcus pyogenes from Acid Stress Using the Arginine Deiminase Pathway and the F₁F_o-ATPase J. Bacteriol. April 2015 197:7 9 1288-1296

Dean, F. et al (2003). Unbiased Whole-Genome Amplification Directly From Clinical Samples. Genome Research, 13(5)

Dushku N, John MK, Schultz GS, Reid TW. Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. Arch Ophthalmol 2001; 119:695-706.

Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. Cornea 2001; 0:164-7.

Dushku N, Reid TW. Does human papillomavirus cause pterygium? Br J Ophthalmol 2003; 87:806-8.

Fricke WF, et al. Human microbiota characterization in the course of renal transplantation. *Am J Transplant.* 2014 Feb;14(2)

Galimand, M.; Gamper, M.; Zimmermann, A.; Haas, D. Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1991, 173, 1598–1606.

Gamper, M.; Zimmermann, A.; Haas, D. Anaerobic regulation of transcription initiation in the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1991, 173, 4742–4750.

Ghannoum, M. et al (2010). Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *PLoS Pathogens*

Gruening, P.; Fulde, M.; Valentin-Weigand, P.; Goethe, R. Structure, regulation, and putative function of the arginine deiminase system of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol.* 2006, 188, 361–369.

KeMa, MD, LiangXu, MD, YingJie, MD, and Jost B. Jonas Prevalence of and Factors Associated with Pterygium in Adult Chinese The Beijing Eye Study. *Cornea* 2007; 26:1184–1186

Lederberg J, McCray AT, 2001, Ome sweet omics-a genealogical treasury of words. *Scientist* 15:8

León Y, Martínez M, Eficacia del trasplante de membrana amniótica radioesterilizada en cirugía de pterigión, Instituto nacional de investigaciones nucleares, Revistas contacto nuclear, No 55, año 2010

Lu LJ, Liu J. Human Microbiota and Ophthalmic Disease. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2016;89(3):325-330

Luthra R et al . Frequency and risk factors for pterygium in the Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol*. 2001 Dec;119(12):1827-32.

Leibowitz H, The Red Eye, *N Engl J Med* 2000; 343:345-351

Maaß, S. et al. Highly precise quantification of protein molecules per cell during stress and starvation responses in *Bacillus subtilis*. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 13, 2260–2276, doi: 10.1074/mcp.M113.035741 (2014).

McCarty CA1, Fu CL, Taylor HR. Epidemiology of pterygium in Victoria, Australia. *Br J Ophthalmol*. 2000 Mar;84(3):289-92.

Meyer, H., Liebeke, M. & Lalk, M. A protocol for the investigation of the intracellular *Staphylococcus aureus* metabolome. *Analytical biochemistry* 401, 250–259, doi: 10.1016/j.ab.2010.03.003 (2010)

Michalik, S. et al. Proteolysis during long-term glucose starvation in *Staphylococcus aureus* COL. *Proteomics* 9, 4468–4477, doi:

10.1002/pmic.200900168 (2009).

Miller S, Surawicz C, Zisman T, The Microbiome and Inflammatory Bowel Disease: Is There a Therapeutic Role for Fecal Microbiota Transplantation?, The American Journal of Gastroenterology 107, 1452-1459 (October 2012).

Miller D, Iovieno A. The role of microbial flora on the ocular surface. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009 Oct;9(5):466-70.

Murube J, Rivas A, Historia del tratamiento del pterigión. Desde Susruta hasta la betaterapia surfocular (parte I). *Stadium, Revista de la Sociedad Española de Oftalmología.* Vol. XXVI, N.1, 2008.

Peng J et al *Pseudomonas aeruginosa* develops Ciprofloxacin resistance from low to high level with distinctive proteome changes. *J Proteomics.* 2016 Oct 19;152:75-87. doi: 10.1016/j.jprot.2016.10.005.

Ratnakar KS, Goswamy V, Agawal LP. Mast cells and pterygium. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1976; 54 (3): 363-368.

Rojas-Álvarez E, El pterigión: más allá de los aspectos médicos. *Rev Cubana Oftalmol* , 2007, vol. 20, n. 2, 2007.

Rojas-Álvarez E, Cirugía del pterigión: una historia que aún no termina, *Arch Soc Esp Oftalmol, Sección histórica,* 2008; 83:333-334

Saw SM1, Tan D., Pterygium: prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiol.* 1999 Sep;6(3):219-28.

Tan DT, Tang WY, Liu YP y col. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:212-6.

The NIH HMP Working Group, Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Guyer, M. et al (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*, 19(12), 2317–2323.

Scholtens P., Oozeer R, Martin R, Amor K, Knol J The early settlers: intestinal microbiota in early life. *Annu. Rev Food Sci, Technol*, 3.425-427.

Wu J, et al. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. *ISME J.* 2016 Mar 25.

Zhou, Y., et al (2014). The conjunctival microbiome in health and trachomatous disease: a case control study. *Genome Medicine*, 6 (11)

Zühlke D, Dörries K, Bernhardt J, et al. Costs of life - Dynamics of the protein inventory of *Staphylococcus aureus* during anaerobiosis. *Scientific Reports.* 2016;6:28172. doi:10.1038/srep28172.

Apéndices

Como se explica en los apartados anteriores, se realizó PCR RT con primers reverse y forward para 16S y PGK-1 para las muestras correspondientes a la homogenización, extracción y purificación de DNA con el kit Innuprep DNA/RNA minikit Analytk Jena y para la estandarización de toma de muestra y elección del material de muestreo. Posteriormente con el fin de evaluar la integridad del DNA y la amplificación específica de cada primer se realizó electroforesis de DNA en gel de agarosa a 1x con 90 V y 500 mA por 45 minutos. En este apartado se mostrarán imágenes representativas. El banco completo de imágenes se encuentra disponible en la bitácora en extenso de este protocolo.

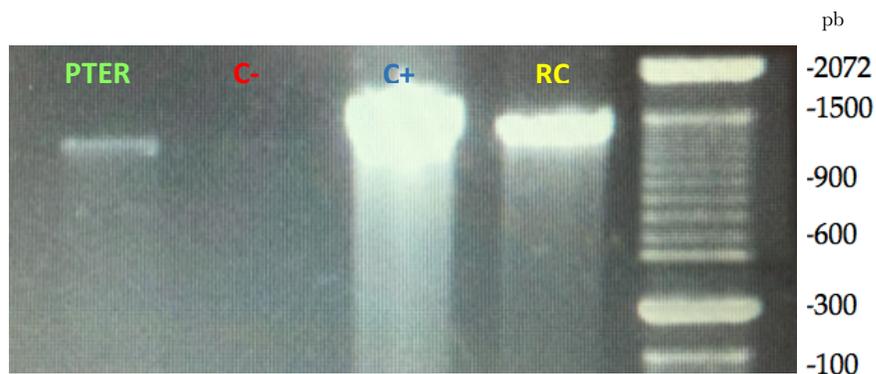


Figura 1. Análisis del gen 16S ribosomal por PCR. Las muestras corresponden al DNA extraído con el kit Innuprep DNA/RNA minikit Analytk Jena. C-: Control negativo/ C+ : Control positivo/ RC: Raspado conjuntival/ PTER: Tejido de Pterigión

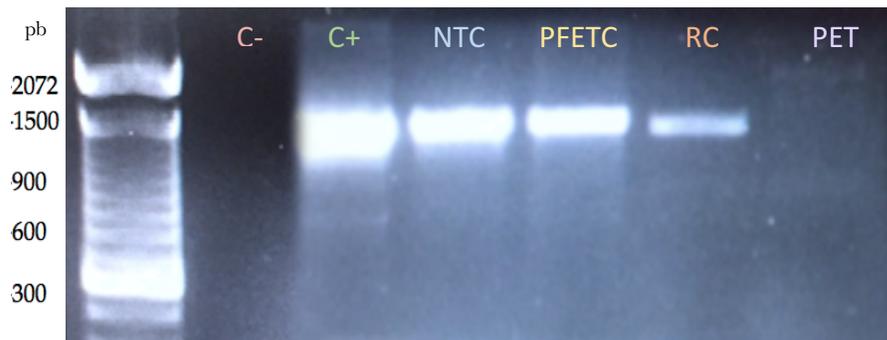


Figura 2. Análisis del gen 16S ribosomal por PCR. Las muestras corresponden a diferentes materiales para la obtención de la microbiota de la superficie ocular. C-: Control negativo/ C+ : Control positivo/ NTC: Membranas de nitrocelulosa/ PFET: Membranas Millipore de tetrafluoroetileno/ RC: Raspado conjuntival/ PET: Membranas Millipore de pterefalato de polietileno.



Table 12. Test Substrates on GP Card.

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	D-AMYGDALIN	AMY	0.1875 mg
4	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	PIPLC	0.015 mg
5	D-XYLOSE	dXYL	0.3 mg
8	ARGININE DIHYDROLASE 1	ADH1	0.111 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
11	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
14	CYCLODEXTRIN	CDEX	0.3 mg
15	L-Aspartate ARYLAMIDASE	AspA	0.024 mg
16	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	BGAR	0.00204 mg
17	ALPHA-MANNOSIDASE	AMAN	0.036 mg
19	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
20	Leucine ARYLAMIDASE	LeuA	0.0234 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
24	BETA GLUCURONIDASE	BGURr	0.0018 mg
25	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
26	L-Pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
27	BETA-GLUCURONIDASE	BGUR	0.0378 mg
28	Alanine ARYLAMIDASE	AlaA	0.0216 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
30	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	POLYMXIN B RESISTANCE	POLYB	0.00093 mg
37	D-GALACTOSE	dGAL	0.3 mg
38	D-RIBOSE	dRIB	0.3 mg

42	D-SORBITOL assimilation	dSORa	0.1875 mg
44	SACCHAROSE/SUCROSE assimilation	SACa	0.3 mg
45	UREASE	URE	0.15 mg
46	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
47	D-TURANOSE assimilation	dTURa	0.3 mg
48	D-TREHALOSE assimilation	dTREa	0.3 mg
49	NITRATE assimilation	NO3a	0.03 mg
51	L-ARABINOSE assimilation	IARaA	0.3 mg
52	D-GALACTURONATE assimilation	dGATa	0.15 mg
53	ESCULIN hydrolysis	ESC	0.225 mg
54	L-GLUTAMATE assimilation	IGLTa	0.15 mg
55	D-XYLOSE assimilation	dXYLa	0.3 mg
56	DL-LACTATE assimilation	LATa	0.15 mg
58	ACETATE assimilation	ACEa	0.15 mg
59	CITRATE (SODIUM) assimilation	CITa	0.15 mg
60	GLUCURONATE ASSIMILATION	GRTas	0.15 mg
61	L-PROLINE assimilation	IPROa	0.15 mg
62	2-KETO-D-GLUCONATE assimilation	2KGa	0.15 mg
63	N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation	NAGa	0.15 mg
64	D-GLUCONATE assimilation	dCNTa	0.15 mg

Table 16. Test Substrates on YST Card.

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
3	L-Lysine-ARYLAMIDASE	LysA	0.0228 mg
4	L-MALATE assimilation	IMLTa	0.15 mg
5	Leucine-ARYLAMIDASE	LeuA	0.0234 mg
7	ARGININE CP	ARG	0.15 mg
10	ERYTHRITOL assimilation	ERYa	0.3 mg
12	GLYCEROL assimilation	GLYLa	0.16 µL
13	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
14	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408 mg
15	ARBUTIN assimilation	ARBa	0.3 mg
18	AMYGDALIN assimilation	AMYa	0.3 mg
19	D-GALACTOSE assimilation	dGALa	0.3 mg
20	GENTIOBIOSE assimilation	GENa	0.3 mg
21	D-GLUCOSE assimilation	dGLUa	0.3 mg
23	LACTOSE assimilation	LACa	0.96 mg
24	METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE assimilation	MadGa	0.3 mg
26	D-CELLOBIOSE assimilation	dCELa	0.3 mg
27	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0.0228 mg
28	D-MALTOSE assimilation	dMALa	0.3 mg
29	D-RAFFINOSE assimilation	dRAFa	0.3 mg
30	PNP-N-acetyl-BD-galactosaminidase 1	NAGA1	0.0306 mg
32	D-MANNOSE assimilation	dMNEa	0.3 mg
33	D-MELIBIOSE assimilation	dMELa	0.3 mg
34	D-MELEZITOSE assimilation	dMLZa	0.3 mg
38	L-SORBOSE assimilation	ISBEa	0.3 mg
39	L-RHAMNOSE assimilation	IRHAa	0.3 mg
40	XYLITOL assimilation	XLTa	0.3 mg

42	D-SORBITOL assimilation	dSORa	0.1875 mg
44	SACCHAROSE/SUCROSE assimilation	SACa	0.3 mg
45	UREASE	URE	0.15 mg
46	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
47	D-TURANOSE assimilation	dTURa	0.3 mg
48	D-TREHALOSE assimilation	dTREa	0.3 mg
49	NITRATE assimilation	NO3a	0.03 mg
51	L-ARABINOSE assimilation	IARaA	0.3 mg
52	D-GALACTURONATE assimilation	dGATa	0.15 mg
53	ESCULIN hydrolysis	ESC	0.225 mg
54	L-GLUTAMATE assimilation	IGLTa	0.15 mg
55	D-XYLOSE assimilation	dXYLa	0.3 mg
56	DL-LACTATE assimilation	LATa	0.15 mg
58	ACETATE assimilation	ACEa	0.15 mg
59	CITRATE (SODIUM) assimilation	CITa	0.15 mg
60	GLUCURONATE ASSIMILATION	GRTas	0.15 mg
61	L-PROLINE assimilation	IPROa	0.15 mg
62	2-KETO-D-GLUCONATE assimilation	2KGa	0.15 mg
63	N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation	NAGa	0.15 mg
64	D-GLUCONATE assimilation	dCNTa	0.15 mg

CESIÓN DE DERECHOS

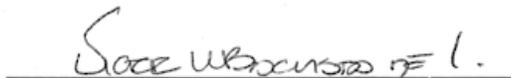
En la ciudad de México D. F., el día 15 del mes de Febrero del año 2021, la que suscribe Dra. Lucero Ramírez Barajas, alumna del Programa de Oftalmología de la Facultad de Medicina, sede académica Instituto Fundación de Asistencia Privada “Conde de Valenciana” I.A.P, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio y cede los derechos del trabajo intitulado “ Asociación de los cambios en la microbiota de la superficie ocular y adaptaciones metabólicas microbianas en pacientes con pterigión de un centro oftalmológico de tercer nivel en la ciudad de México“, a la Universidad Nacional Autónoma de México para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben de reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director del trabajo bajo reserva de contravenir tácitamente a la ley Federal de derechos y protección del autor. El permiso puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección electrónica vbautistal@institutodeoftalmologia.org . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y cita la fuente del mismo.



Lucero Ramírez Barajas

Autora de Tesis



Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio

Jefe del departamento de Departamento de Microbiología y Proteómica Ocular, Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología, Fundación Conde de Valenciana.