



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN
CIENCIAS DE LA SALUD
HOSPITAL CIVIL DE CULIACÁN



**Caracterización de biomarcadores tipo microRNAs para Alzheimer en
oftalmopatías neurodegenerativas: Glaucoma y DMRE**

Tesis para obtener el grado de especialista en: **Retina y Vítreo**

DR. ABEL RAMON CONCEPCIÓN

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Efraín Romo García
Cirujano oftalmólogo con Alta Especialidad en Retina
Director de Tesis

Dr. Felipe de Jesús Peraza Garay
Doctor en Ciencias
Asesor estadístico y metodológico

Culiacán Rosales a Febrero de 2020

Director del Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud
Dr. Carlos Fernando Corona Sapiens

Subdirector de Investigación
Dr. Edgar Dehesa López

Subdirector de Enseñanza
Dra. Erika María Celis Aguilar

Jefe de Servicio de Oftalmología
Dr. Efraín Romo García

Director de Tesis
Dr. Efraín Romo García
Cirujano Oftalmólogo con Alta Especialidad en Retina
Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud
Hospital Civil de Culiacán

Dr. Felipe de Jesús Peraza Garay
Doctor en Ciencias
Asesor estadístico

ÍNDICE

CAP. 1 MARCO TEÓRICO.....	6
CAP. 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
CAP. 3. . JUSTIFICACIÓN.....	13
CAP. 4 OBJETIVO GENERAL.....	14
CAP. 5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
CAP. 6 MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Diseño del estudio.....	15
6.2 Universo del estudio.....	15
6.3 Ubicación Espacio-Temporal.....	15
6.4 Criterios de inclusión.....	15
6.5 Criterios de exclusión	15
6.6 Criterios de eliminación.....	15
6.7 Análisis estadístico.....	15
6.8 Cálculo del tamaño de muestra.....	16
6.9 Descripción general del estudio.....	16
6.10 Definición operacional de variables.....	18
6.11 Estandarización de instrumentos de medición.....	18
6.12 Descripción general de procedimientos.....	19
CAP. 7. ASPECTOS ÉTICOS.....	19
CAP. 8. RECURSOS Y FINANCIAMIENTO	20
CAP. 9. RESULTADOS.....	23
CAP. 10. DISCUSIÓN.....	26
CAP. 11 CONCLUSIONES	30
CAP. 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAP. 13. ANEXOS.....	35

CAPÍTULO 1

MARCO TEORICO

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

DEFINICION

Las enfermedades neurodegenerativas afectan el sistema nervioso central y provocan una disfunción progresiva. Estas condiciones debilitantes e incurables se caracterizan por la pérdida de la función celular neuronal y se asocian a menudo con atrofia de las estructuras del sistema nervioso afectadas. Un subconjunto importante de las enfermedades neurodegenerativas se refiere a las demencias asociadas con el envejecimiento, siendo la enfermedad de Alzheimer la más importante.^{1,2}

Los recientes avances en nuestra comprensión de los mecanismos en la cascada de eventos que resultan en la muerte de células retinianas en patologías oculares como el glaucoma, la retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad conducen al término descriptivo común de las enfermedades neurodegenerativas de la retina. La vía fisiopatológica final común de estas enfermedades incluye una forma particular de estrés metabólico, lo que resulta en un suministro insuficiente de nutrientes a las respectivas estructuras diana (cabeza del nervio óptico y retina) y la formación de oligómeros tóxicos y de las placas β -amiloides, resultado del desequilibrio entre la producción y la eliminación extracelular de los péptidos β -amiloide.^{3,4}

Recientes evidencias han mostrado que la generación de estos péptidos, además del cerebro, también están presentes en la retina, debido a su origen prosencefálico, y que su acumulación de manera tóxica puede contribuir a la patogénesis del glaucoma y la degeneración macular relacionada a la edad. Estas oftalmopatías cursan con características etiológicas comunes con la enfermedad de Alzheimer, como son: excitotoxicidad, estrés oxidativo, neuroinflamación, gliosis crónica, cambios degenerativos trans-sinápticos y factores de riesgo genético. Actualmente ya se estudian las manifestaciones oculares, especialmente en la retina, de pacientes con alguna enfermedad neurodegenerativa, como la enfermedad de Alzheimer, se reportan alteraciones vasculares como el aumento en la tortuosidad de los vasos de la retina y adelgazamiento de la capa de fibras nerviosas de la retina lo que sugiere manifestaciones en la circulación previa a la muerte celular.⁵

TIPOS DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno irreversible y progresivo del sistema nervioso, una neuropatía que destruye lentamente la memoria y las habilidades de pensamiento y finalmente la capacidad de llevar a cabo las tareas más simples. Es un creciente problema de salud mundial con enormes implicaciones individuales y en la sociedad.^{6,7}

Es la causa más común de demencia en adultos mayores. Mientras que la demencia es más común a medida que la gente envejece, no es una parte normal del

envejecimiento. Se calcula que entre 2010 y 2050, el número total de personas dependientes en todo el mundo casi se duplicará, con un aumento de 349 a 613 millones, y más de un tercio de estas personas (con un aumento de 101 a 277 millones) serán personas mayores. El aumento del número de ancianos dependientes es desproporcionadamente mayor en los países emergentes y en desarrollo.^{8,9}

Las características patognomónicas son placas amiloides compuestas de fragmentos proteolíticos de la proteína precursora amiloide (APP) y neurofibrillas compuestas de proteína tau hiperfosforilada.¹⁰

En México 7% de la población mexicana presenta deterioro cognitivo leve y un 3,3% deterioro cognitivo importante, con dependencia funcional. La prevalencia es mayor entre las mujeres y en la edad avanzada. Los factores más claramente asociados son: analfabetismo, diabetes, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardíaca y depresión.^{11,12}

La prevalencia de demencia en México para las áreas urbanas es 7,4% y en las regiones rurales en el 7,3%. Se calcula que existen en el país 800.000 personas afectadas. La proyección del número de mexicanos afectados por demencia para el año 2050 alcanzará la alarmante cifra de 3,5 millones y el impacto de la enfermedad en los sistemas económicos, sociales y de salud será aún más grave.¹³

GLAUCOMA

Pese a las modificaciones realizadas y a la dificultad de consenso para definir puntualmente al Glaucoma, la Academia Americana de Oftalmología lo define como: “ Una neuropatía óptica progresiva con cambios estructurales característicos del nervio óptico, acompañada con frecuencia por cambios correspondientes en el campo visual.” Existen una variedad de factores entre los que se incluye la presión intraocular (PIO), que aumenta el riesgo de desarrollar Glaucoma. La neuropatía óptica glaucomatosa puede ser definida como la vía final común de un grupo de condiciones que comparten propiedades biológicas y características clínicas semejantes. Ambos sexos son susceptibles de padecer glaucoma, sin embargo, parece haber un ligero predominio en las mujeres. ^{14,15}

Glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible en el mundo. Se estima que afecta a 60 millones de personas en el mundo. Se define como un grupo de neuropatías ópticas con cambios característicos en la cabeza del nervio óptico y en el campo visual. ¹⁶

En México existen pocos estudios confiables de la prevalencia de glaucoma, sin embargo, según el estudio de financiamiento de la atención a la salud de la población de la tercera edad, se refiere que el glaucoma en México está entre las primeras 10 causas de consulta y de morbilidad en los pacientes mayores de 60 años de edad. Desgraciadamente en el caso de México no se cuenta con una cifra estimada de pacientes con Glaucoma, los estudios realizados han sido limitados a pocos centros y no han determinado una prevalencia de la enfermedad, sin

embargo, tampoco se ha reportado una evolución de la enfermedad diferentes respecto a la de otras razas como a asiática y la negra por lo que se estima que la prevalencia no difiere en gran medida de la reportada por los organismos máximos de salud en el mundo. ¹⁷

CLASIFICACION

Es necesario al hablar de Glaucoma definir el grupo de enfermedades que se integran en este diagnóstico:

1. Hipertensión ocular: Presión intraocular por arriba de los 21 mmHg, sin presencia de daño glaucomatoso en la cabeza del nervio óptico, con presencia de ángulo camerular abierto corroborado por gonioscopía y ausencia de cualquier padecimiento ocular que pueda incrementar la presión intraocular
2. Glaucoma de tensión normal: Presión intraocular por debajo de 21mmHg que presente daño glaucomatoso del disco óptico, ya sea una excavación anormal mayor del 0.5 o una asimetría entre los discos ópticos de ambos ojos mayor de 0.2, en ausencia de otra patología ocular.
3. Glaucoma de ángulo abierto: Presión intraocular por arriba de 21mmHg con daño glaucomatoso al nervio óptico y apariencia del ángulo camerular abierto corroborado por gonioscopía.
4. Glaucoma de ángulo cerrado: Presión intraocular por arriba de 21mmHg con daño glaucomatoso a la cabeza del nervio óptico, con ángulo camerular parcial o totalmente cerrado, o evidencias de goniosinequias, evidencia objetiva de episodios de cierre de angular (atrofia del iris, pupila irregular, midriasis no reactiva) y sin signos de

cierre secundario del ángulo (uveítis, cristalino intumesciente o dislocado, microesferofaquia, etc.)

5. Glaucoma Neovascular: Presión intraocular por arriba de 21mmHg, la cual se debe al cierre del ángulo camerular por sinéquias mediante la contracción de tejido fibrovascular, el cual se puede deber a diferentes causas como obstrucción de la vena central de la retina, pacientes diabéticos de larga evolución, tumores intraoculares, etc.
6. Glaucoma secundario afáquico/pseudofáquico: aquellos pacientes que presenten presión intraocular por arriba de 21mmHg, que no tengan diagnóstico de glaucoma previo a su cirugía de catarata y/o que tengan daño glaucomatoso a la cabeza del nervio óptico.

DEGENERACION MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (DMAE)

Es la causa más común de discapacidad visual irreversible en mayores de 60 años en los países industrializados. En el año 2000, se estimó que más de nueve millones de personas tenían DMAE en los Estados Unidos. Se predice que su prevalencia se duplicará para 2020. ^{18,19}

Se clasifica en dos formas principales: No neovascular (también conocida como "seca" o "no-oxidativa") y neovascular (también conocida como "húmeda" o "exudativa"). ²⁰

La característica clínica de la DMAE no neovascular es la drusa, que es un depósito amarillento a nivel del epitelio pigmentario de la retina (EPR), que se encuentra justo debajo de la retina neurosensorial. También se puede ver hiperpigmentación y atrofia del EPR focal. La "atrofia geográfica" es el estadio avanzado de la DMAE no

neovascular, donde las áreas de atrofia se vuelven confluentes y causan pérdida visual. La DMAE neovascular es también una manifestación avanzada de la DMAE, caracterizada por neovascularización coroidea (NVC): vasos sanguíneos anormales que generalmente surgen en la coriocapilar y que a menudo invaden el espacio subretiniano.²¹

Solo alrededor del 10% de los pacientes con DMAE tienen la forma neovascular, sin embargo, causa el 90% de la ceguera relacionada con la DMAE. El reciente desarrollo de agentes anti factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ha revolucionado la terapia para esta afección y ahora se puede evitar la pérdida de la visión en más del 90% de los pacientes con DMRE neovascular, con aproximadamente un tercio de los pacientes experimentando mejoras significativas en la agudeza visual.²²

MICRORNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una nueva clase de pequeños RNAs (18-25 nucleótidos) de una sola cadena no codificante, implicados en la post-transcripción reguladora de la expresión génica. Están involucrados en casi todos los procesos biológicos como proliferación, desarrollo, apoptosis, inflamación y su expresión es altamente regulada por enzimas o mecanismo epigénicos. Tienen una distribución específica en los tejidos y se ha encontrado su proliferación en enfermedades crónicas. Se encuentran en todos los fluidos biológicos humanos como el plasma y la sangre periférica. Pueden ser medidos por diferentes métodos, los más utilizados son Chip de ADN y PCR cuantitativa.²³

Recientemente se comienzan a estudiar biomarcadores tipo microRNA en el estudio de patologías crónicas, cáncer, infecciones y degenerativas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer se han establecido puntualmente el rol de marcadores como MiR-9, MiR-155 y el MiR-34 como involucrados en la fisiopatología de la neurodegeneración. Estos marcadores pueden ser medidos en sangre periférica.

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los microRNAs relacionados a enfermedad de Alzheimer muestran un perfil de expresión en sangre periférica en pacientes con degeneración macular y glaucoma?

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACION

La importancia del estudio de los microRNAs ya conocidos e involucrados en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer es que pueden servir como biomarcadores para otras enfermedades neurodegenerativas oftalmológicas como la DMAE y el Glaucoma. Su estudio cobra importancia desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico. Si se puede identificar un perfil de expresión en sangre periférica será posible establecer diagnósticos tempranos sin necesidad de estudios invasivos como resonancia magnética, tomografía o punciones lumbares. Desde el punto de vista terapéutico, en otras áreas como la oncología se han dirigido actualmente fármacos capaces de modular la expresión de microRNAs modificando el curso natural de la enfermedad, por lo que es factible en los casos de

oftalmopatías degenerativas considerar la modificación genética como alternativa terapéutica.

HIPOTESIS

Los microRNAS relacionados a Alzheimer muestran un perfil de expresión en sangre periférica de pacientes con Glaucoma y degeneración macular.

CAPÍTULO 4

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de expresión de microRNAs en sangre periférica en pacientes con DMAE y Glaucoma

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Medir en sangre periférica los niveles de microRNAs relacionados con Alzheimer en pacientes con DMAE y Glaucoma
- Comparar los niveles de expresión de microRNAs en sangre periférica entre pacientes con DMAE, Glaucoma y Sanos.

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO Y TAXONOMÍA DEL ESTUDIO

DISEÑO: Estudio Observacional

TAXONOMIA: Estudio longitudinal, comparativo.

6.2 UNIVERSO DEL ESTUDIO

Se incluirán pacientes con diagnóstico de Alzheimer, DMAE, Glaucoma y sanos.

6.3 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

LUGAR DE REALIZACIÓN: Hospital Civil de Culiacán

PERIODO: Marzo de 2017 al Marzo de 2019.

6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de DMAE, Glaucoma y sanos sin enfermedades metabólicas. Mayores de 18 años. Sin importar género.

6.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Enfermedad metabólica como Diabetes Mellitus, Hipercolesterolemia, etc.

6.6 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Pacientes que resultaron con enfermedad metabólica en el análisis de sangre periférica.

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos categóricos se describieron con frecuencias y porcentajes, los numéricos con medias y desviación estándar. Para analizar las diferencias entre los grupos

con variables categóricas se utilizó la prueba Chi-cuadrada y ANOVA de una vía para comparar las medias de las diferencias entre grupos. Los datos se analizaron en SPSS v21. Un valor de p menor a .05 se consideró estadísticamente significativo.

6.8 CÁLCULO DE MUESTRA

Se incluyeron todos los pacientes que cumplieron los criterios los criterios de inclusión durante el periodo de Marzo de 2017 a Marzo de 2019.

6.9 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Captación de Pacientes: Todos los pacientes que acudieron al Departamento de Glaucoma y Retina del Servicio de Oftalmología del Hospital Civil de Culiacán para consulta de seguimiento.

Se les realizó una exploración oftalmológica completa que incluyó Agudeza visual mediante los optotipos de la cartilla de Snellen, exploración biomicroscópica, toma de presión intraocular con tonómetro de aplanación de Goldmann.

Recolección de datos: Se obtuvieron del expediente clínico los datos demográficos: Género y edad; así como los datos clínicos pertinentes: comorbilidades, antecedentes oftalmológicos, signos y síntomas visuales y registro de hallazgos en la exploración oftalmológica. Se llenó cuestionario de enfermedades metabólicas o sistémicas.

Datos de gabinete: Se realizó Química sanguínea y Biometría hemática.

Primera Fase: Se determinó si el paciente cumplía con los criterios de inclusión y si contaba con diagnóstico establecido de Glaucoma o DMAE.

Segunda Fase: Se realizó toma de muestra de sangre periférica.

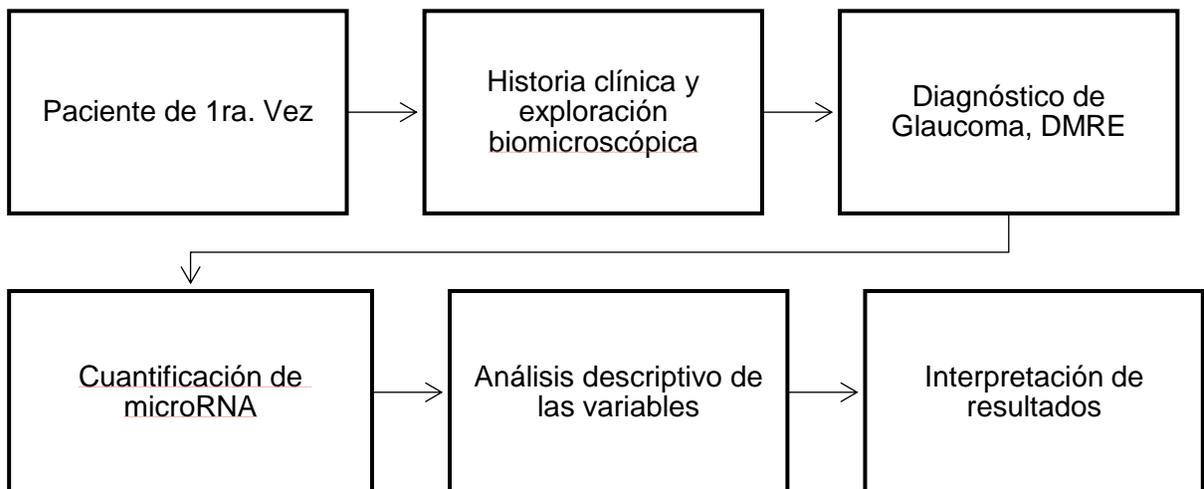
Análisis de los datos:

Una vez recolectados los datos demográficos, clínicos y de gabinete se procedió al vaciamiento de los mismos en una base de datos del programa SPSS V21 para su organización, codificación y análisis estadístico propuesto.

Reporte y redacción de los resultados:

Una vez concluido el análisis estadístico de los datos, se procedió a la interpretación crítica de los resultados y posteriormente a la redacción de la tesis con los resultados obtenidos.

Diagrama:



6.10 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

VARIABLE	INDICADORES	CLASIFICACIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	OPERALIZACIÓN DE LAS VARIABLES
Sexo	Caracteres sexuales primarios	Categórica	Nominal (Dicotómica)	Femenino Masculino
Edad	Años de vida cumplidos	Cuantitativa	Continua	0 a 100 años
microRNA	ARN monocatenario en sangre periférica	Cuantitativa	Continua	Copias/microlitro (μ L)
DMAE	Degeneración y atrofia de retina central	Categórica	Dicotómica	Húmeda Seca
Glaucoma	Daño al nervio óptico	Categórica	Dicotómica	Ángulo cerrado Ángulo abierto

6.11 ESTANDARIZACIÓN DE INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN

Biomicroscopía: Lámpara de hendidura marca Haag Streit o Topcon.

Toma de PIO: Tonómetro de Aplanación de Goldmann

Equipo: Se usó para cuantificación de microRNAs el termicoclador RT-PCR.

StepOnePlus. Applied Biosystems™

6.12 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS PROCEDIMIENTOS

Se realizó identificación de pacientes con diagnóstico de Degeneración macular asociada a la edad o Glaucoma en los departamentos de retina, posterior a evaluación oftalmológica completa se procedió a la toma de 1 ml de sangre periférica, previo llenado y explicación del consentimiento informado, se realizó almacenamiento en cadena de frío y transporte de muestras al laboratorio de Genética y Biología molecular de enfermedades neurodegenerativas de la Universidad Autónoma de Sinaloa para el análisis para cuantificación de niveles de microRNAs mediante técnica de RT PCR (Reverse Transcription Polymerase chain reaction, por sus siglas en ingles). Se mantuvo en todo momento la red de frío para transportación de las muestras. Se creó base de datos para la organización, codificación y análisis estadístico propuesto.

ESQUEMA DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Purificación de miRNAs totales. La purificación de miRNAs se realizó utilizando el kit de Qiagen miRNeasy-serum/plasma (catalogo217184), cuyo principio combina la lisis de las muestras mediante fenol/guanidina (extracción orgánica) y la purificación del miRNA total mediante una membrana de sílica. La extracción de miRNAs totales se realizó a partir de 100-200 μ L de plasma de cada individuo. Se procedió según las instrucciones del fabricante.

Retro-transcripción (RT), Síntesis de cDNA. Los miRNAs totales purificados fueron convertidos a cDNA mediante el kit miScript de Qiagen (catalogo218161). Debido a que los miRNAs maduros no están poli-adenilados y a que el tamaño molecular es de 21-25 nt, el sistema miScript en el mismo proceso realiza una

reacción de poli-adenilación previo a la reacción de RT (Figura 2). Es entonces cuando en la RT se utiliza un oligonucleótido poli-dT unido a un Tag universal, como iniciador de la reacción. En la reacción de PCR este oligonucleótido fue el primer Universal. La reacción de RT se realizó en un volumen final de 20 μ L, el cual contenía: 500-1000 ng miRNA total, Buffer miScript HiSpec 1X, miScript Nucleics mix 1X y miScript Reverse Transcriptase Mix 1X (contiene el oligo-dT-Tag). La reacción fue incubada a 37 °C por 60 minutos. La retro-transcriptasa fue inactivada incubando la reacción a 95 °C por 5 minutos.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)-tiempo real. Los miRNAs específicos fueron cuantificados mediante PCR tiempo real, utilizando el kit comercial Qiagen miScript SYBR Green PCR (catalogo218073). La reacción se realizó en un volumen final de 20 μ L, con los siguientes componentes: 50 pg-3 ng de cDNA, SYBR Green PCR Master Mix 1X (contiene HotStarTaq DNA polimerasa y el buffer correspondiente), miScript Primer Universal 0.5X (primer anti-sentido) y miScript primer assay 0.5X (primer sentido, específico para cada miRNA). Como controles constitutivos se evaluaron los RNAs pequeños nucleolares 61 y 68 (Hs_SNORD61_11 y Hs_SNORD68_11). En paralelo a las reacciones de PCR con el cDNA de las muestras de pacientes, se realizó una curva estándar con cDNA obtenido a partir de miRNA sintético para cada molécula en estudio.

La reacción fue corrida en el termociclador tiempo real StepOne de Applied Biosystems, en las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial a 95°C por 15 min; 40 ciclos de: 94 °C por 15 s, 55 °C por 30 s y 70 °C por 30 s. Cada reacción fue montada por triplicado.

CAPÍTULO 7

ASPECTOS ÉTICOS

Número de registro de investigación: **0312**

El protocolo se sometió a evaluación por parte del Comité de Investigación del CIDOCS y el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UAS (**CONBIOÉTICA-25-CEI-003-20181012**), con número de registro **CEI-FM-PI-2018-003**. se recabaron en todos los casos la firma de consentimiento informado. La investigación corresponde a una **investigación con riesgo mínimo** para el paciente, según el artículo 17 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud de nuestro país (CAPITULO I / TITULO SEGUNDO: De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos).

CAPÍTULO 8

RECURSOS Y FINANCIAMIENTO

Recursos Humanos:

- Médicos Adscritos.
- Residentes del servicio de Oftalmología.
- Químicos de laboratorio

Recursos materiales:

- Pago de consulta primera vez: \$150 pesos

- Pago de consulta de Retina y Glaucoma: \$150 pesos (Ya eran subsecuentes)
- Estudio de QS y BH Sin Costo para el paciente
- RT-PCR: Sin costo para el paciente
- Para anotación consumibles de papelería, computadora, impresora, paquete estadístico.

Infraestructura:

Instalaciones del servicio de Oftalmología de HCC-CIDOCS

- Lámpara de hendidura marca Haag Streit o Topcon.
- Lupas de 90D y de 78D Volk
- Equipo Termociclador para RT PCR. StepOnePlus. Applied Biosystems™

CAPÍTULO 9

RESULTADOS

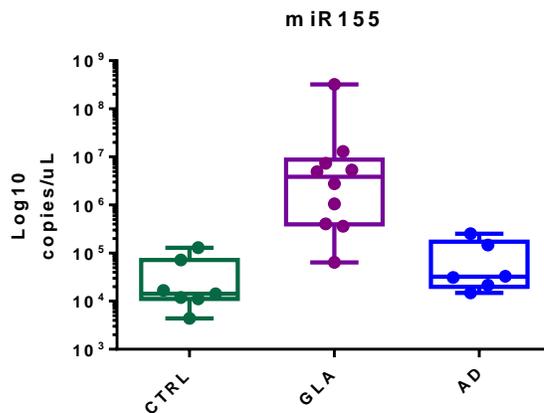
Se incluyeron para este estudio piloto 55 pacientes distribuidos en cuatro grupos: 10 (18.18%) pacientes con la enfermedad de Alzheimer, 20 (36.36%) pacientes con Glaucoma, 5 (9.09%) pacientes con Degeneración macular relacionada a la edad y 20 (36.36%) individuos control sanos .

En cuanto al género 30 (54.54%) mujeres y 25 (45.45%) hombres.

	Controles	Glaucoma	Alzheimer	DMRE
(n)	20	20	10	5
EDAD (Años)	57±11	65 ±13	68 ±10	67±11
Género (M/F)	(9/11)	(8/12)	(3/9)	2/3

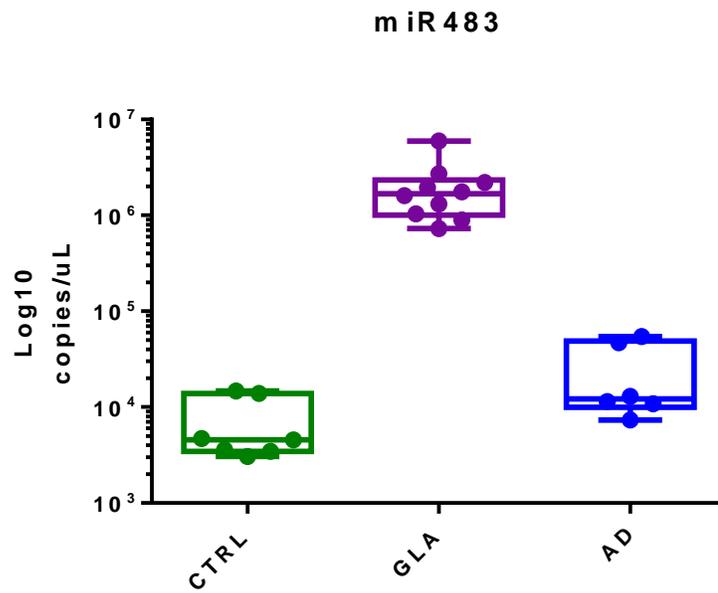
Tabla 1. Datos demográficos

De los microRNAs estudiados y analizados se encontró sobreexpresado el miR155 3 veces más en el grupo Glaucoma. Es decir, una regulación a la alta.



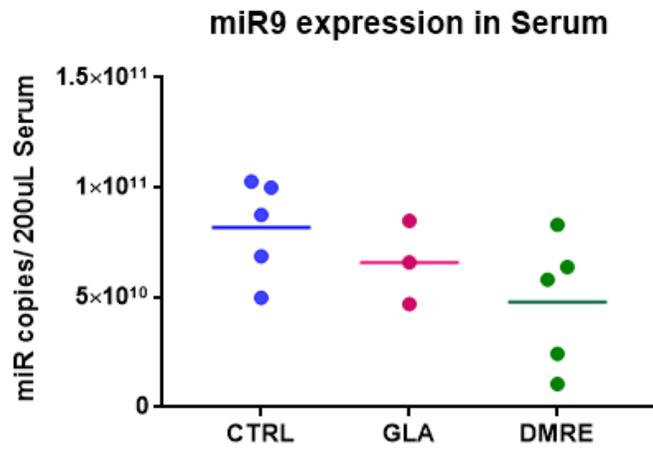
Gráfica 1. miR155. Regulación positiva. Sobreexpresado 3 veces más en pacientes con Glaucoma, similar en pacientes con Alzheimer comparado con controles.

El miR483 se encontró sobreexpresado 2 veces más en el grupo Glaucoma, similar en pacientes con Alzheimer comparado con controles.



Gráfica 2. miR483. Regulación positiva.

Sobreexpresado 2 veces más en Glaucoma, similar en pacientes con Alzheimer comparado con controles



Gráfica 3. miR9. Se encontró regulación negativa. El grupo de DMRE con una expresión 50% menor que el grupo control

CAPÍTULO 10

DISCUSION

Actualmente se está estudiando el papel particular de distintos microRNAs. Chen y cols encontraron biomarcadores retinianos en pacientes con degeneración macular asociada a la edad que incluyen drusas, pseudodrusas, atrofia macular y depósitos subepitelio pigmentado de la retina que se correlacionan con la agudeza visual y sugieren la necesidad de buscar en estos pacientes indicadores genéticos que tengan relación con neurodegeneración.²⁴ Esto es respaldado por la teoría de que la retina y el nervio óptico son extensiones directas del sistema nervioso central, por lo que indicadores genéticos que han sido encontrados en el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer podrían también encontrarse a nivel ocular y en sangre periférica.

Alexandrov estudió un grupo de 6 microRNAs asociados con neurodegeneración en plasma de pacientes con enfermedad degenerativa y encontró desregulaciones en miR502, miR103, miR301, miR142, miR200, ninguno de ellos similar a los estudiados en el presente trabajo²⁵. Abriendo un área de interés importante ya que demostró que en sangre periférica también hay niveles suficientes y que pueden ser medidos con técnicas especiales como PCR, esta búsqueda dirigida en muestras de sangre y no en biopsias del sistema nervioso central se postulan para comenzar a investigar pruebas serológicas como marcadores genéticos preestablecidos que permitan diagnósticos tempranos y menos invasivos, así como la disminución del coste de estudios como resonancia magnética nuclear para la evaluación de un

daño ya establecido en la sustancia blanca y gris de pacientes con neurodegeneración.

Sin embargo, acorde a los resultados obtenidos con el panel de microRNAs incluidos en nuestro trabajo Romano y cols en 2017 describieron la desregulación a la alta del miR9, sin embargo en modelo animal, también reportan otros microRNAs como miR23, miR27, miR34, miR126 y miR146 que en el presente trabajo no se incluyeron. Romano encontró de manera similar que en el presente trabajo varias desregulaciones puntuales, sin embargo, fueron en modelos animales y experimentales²⁶, por lo que es necesario estudiar microRNAs similares en pacientes con oftalmopatías relacionadas a neurodegeneración como glaucoma y degeneración macular asociada a la edad, así como comparar estos resultados con pacientes que se consideran sanos y observar las discrepancias de los niveles encontrados en sangre periférica. Sin embargo es necesaria la generación de conocimiento básico que en el futuro se podrá ampliar y servirá como camino para nuevas series y trabajos.

Al momento no se conocen exactamente las vías involucradas o la actividad específica que produce una regulación a la alta o a la baja de alguno de la mayoría de los microRNAs, la teoría apunta a que juegan un papel fundamental en factores de apoptosis, factores neurotróficos y de señalización celular, sin embargo debido a que en las funciones neurales se involucran muchas vías al mismo tiempo es difícil atribuir alguna desregulación específica a una actividad patológica en particular. Se necesitan más trabajos en el futuro para responder preguntas que surgen del

estudio de estos fragmentos de DNA que sin duda están involucrados en la neurodegeneración.

Las distintas series estudiadas, como las de Anderson y Berber indican que existen muchos microRNAs involucrados en procesos de neurodegeneración^{27,28,29}, para términos de muestras de laboratorio resulta costosa la búsqueda generalizada de microRNAs, por lo que la búsqueda intencionada de alteraciones ya conocidas en Alzheimer es una excelente línea de investigación para buscar estas mismas alteraciones en particular en sangre periférica de pacientes con glaucoma y DMAE, es decir, la enfermedad modelo de neurodegeneración que es Alzheimer nos sirve como guía o dirección de referencia para una búsqueda dirigida de microRNAs en pacientes con neurodegeneración a nivel ocular.

Si bien existen distintas enfermedades neurodegenerativas se prefirió utilizar a la enfermedad de Alzheimer por ser la enfermedad neurodegenerativa más estudiada y prevalente, Zhuang y Yan publicaron varios trabajos^{30,31} involucrando a los microRNAs como elementos genéticos que deben estar involucrados desde el inicio de la enfermedad y se postulan para una nueva terapia temprana, para fines de este trabajo sirvió como piedra angular para estudiar esos mismos microRNAs ya relacionados a neurodegeneración cognitiva pero ahora en pacientes con enfermedad retiniana degenerativa como degeneración macular asociada a la edad y procesos degenerativos del nervio óptico como el Glaucoma.

Se seguirá estudiando a los pacientes que presentaron alteraciones en el perfil de expresión genético a nivel de los microRNAs, sobre todo a aquellos con alteraciones puntuales, se les realizará estudio genético con distintos paneles de microRNAs, así como pruebas de campo visual, tomografía de coherencia óptica y evaluaciones cognitivas para correlacionar cambios tempranos en las respuestas visual y cognitivas con las alteraciones encontradas en sangre periférica, sin embargo esos resultados no se incluyen para fines de este trabajo.

También con este trabajo se demuestra que los niveles serológicos de microRNAs en pacientes con Glaucoma y Degeneración macular sí manifiestan un perfil de expresión, similar en algunos casos al patrón descrito para Alzheimer; y que esto los hace candidatos potenciales para ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico temprano de neurodegeneración retiniana. La regulación a la baja en particular del mir9 comparados con los controles debe ser estudiada a profundidad, ya que podría ser una deficiencia, lo que abre paso a una línea de tratamiento.

Se encontraron alteraciones también en pacientes sanos, en el caso del mir483, por lo que a estos pacientes serán seguidos para buscar en el futuro la presentación de algún dato de enfermedad neurodegenerativa en sistema nervioso central o en tejido retiniano o nervio óptico que por el momento no es evidente clínicamente o perceptible en estudios diagnósticos especializados como la tomografía de coherencia óptica o los campos visuales.

CAPÍTULO 11

CONCLUSION

Los resultados preliminares observados en este estudio, pueden sugerir que los microRNAs miR9, miR155 y miR483 muestran niveles en sangre periféricas que pueden ser medidos de manera repetible y confiable, esto abre paso a una nueva ruta de diagnóstico temprano y posible tratamiento; y así las biopsias postmortem de sistema nervioso central, los estudios costosos como la resonancia magnética dejan de ser la única forma de estudiar y abordar a la neurodegeneración dentro y fuera del sistema nervioso central.

La sangre venosa periférica fue una ruta confiable de investigación de microRNAs, ya que es mínimamente invasiva comparada con otras rutas clásicas de diagnóstico como la punción lumbar. Se pueden obtener muestras serológicas que con una red de frío convencional son fácilmente transportables y que, con el equipo adecuado, en este caso RT-PCR, se pueden evaluar de forma segura y repetible con volúmenes muy pequeños.

Nuestros resultados indicaron que la cuantificación de microRNAs con PCR-tiempo real es posible y es capaz de determinar los niveles plasmáticos para establecer perfiles de expresión. El impacto de estos perfiles debe ser estudiada para determinar su papel específico en la cadena de neurodegeneración.

No se presentó ningún efecto adverso en la toma de sangre venosa periférica a pesar de ser pacientes añosos o con difícil interacción, por lo que se considera una toma de muestra segura, ni dificultad alguna en el almacenamiento de las muestras en laboratorio ya que no se presentaron pérdidas de muestras obtenidas.

Los microRNAs incluidos en el análisis de este trabajo, miR9, miR483 y miR155, son potenciales biomarcadores de desregulación genética y abren el camino para la búsqueda de opciones terapéuticas que impacten en la evolución de la neurodegeneración.

Se sugieren nuevos estudios con mayor número de pacientes, diferentes técnicas de medición y mayor seguimiento, aunque la mayoría de los reportes al momento incluyen una muestra pequeña debido a la dificultad de excluir otras enfermedades metabólicas que modifican las mediciones de microRNAs y el coste elevado del equipo para el estudio genético.

CAPÍTULO 12

REFERENCIAS

1. Griffin, W.S.T. Inflammation and neurodegenerative disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83, 472S-474S.
2. Bertram L, Tanzi RE (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest*, 115:1449–1457
3. K.-G Schmidt, H Bergert,² and R.H. W Funk³ · Neurodegenerative Diseases of the retina and potential for the potential ad recovery. *Curr Neuropharmacol.* 2008 Jun; 6(2): 164–178.
4. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349:704–706
5. Sha Sha Yu^{1,2,3}, Xin Tang³, Yuen-Shan Ho⁴, Raymond Chuen-Chung Chang^{5,6,7*} and Kin Chiu. Links between the brain and retina. The effects of cigarette smoking-induced age- related changes in alzheimer disease and macular degeneration. *Front. Neurol.* 7:119.
6. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2017 Sep 4. 10.1111/ene.13439.
7. Anandtheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani MG. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol.* 2003; 16:41–54.
8. Alzheimer's disease international (ADI) Policy Brief for Heads of Government: The Global Impact of Dementia. Alzheimer's disease International. London, UK; 2013. <http://www.alz.co.uk/research/GlobalImpactDementia2013.pdf>.
9. Arendt T. Alzheimer's disease as a loss of differentiation control in a subset of neurons that retain immature features in the adult brain. *Neurobiol Aging.* 2000; 21:783–96.
10. Bearer, E. L., Manifold-Wheeler, B. C., Medina, C. S., Gonzales, A., Chaves, F., & Jacobs, R. E. (2018). Alterations of functional circuitry in aging brain and the impact of mutated APP expression. *Neurobiology of Aging.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.018>.
11. Mejía-Arango S, Miguel-Jaimes A, Villa A, et al. Cognitive impairment and associated factors in older adults in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2007;49:S475-81.
12. Llibre JJ, Ferri CP, Acosta D, et al. Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet.* 2008;372:464-74.
13. Gutiérrez Robledo LM, Arrieta Cruz I. Plan de acción Alzheimer y otras demencias, México. Instituto Nacional de Geriátría/Secretaría de Salud. http://inger.gob.mx/bibliotecageriatria/acervo/pdf/plan_alzheimer_WEB.pdf. México. 2014.
14. American Academy of Ophthalmology (AAO). Basic and clinical Science course. Section 10 Glaucoma. 2012

15. Leffler C.T., Schwartz S.G., Hadi T.M., Salman A., Vasuki V. The early history of glaucoma: the glaucous eye (800 BC to 1050 AD) Clin Ophthalmol. 2015;9:207–215.
16. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. The British journal of ophthalmology 2006 Mar;90(3):262-7.
17. Durán-Arenas, L.; Sánchez, R.; Vallejo, M.; Carreón, J.; Franco, F.: Financiamiento de la atención a la salud de la población de la tercera edad Salud Publica Mex, 1996; 38:501- 512.
18. Friedman, D.S.; O'Colmain, B.J.; Munoz, B.; Tomany, S.C.; McCarty, C.; de Jong, P.T.; Nemesure, B.; Mitchell, P.; Kempen, J. Prevalence of age-related macular degeneration in the united states. Arch. Ophthalmol. 2004, 122, 564–572.
19. Klein R, Klein BE, Cruickshanks KJ. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and ethnicity. Prog Retin Eye Res. 1999; 18: 371-389
20. Klein, R.; Chou, C.F.; Klein, B.E.; Zhang, X.; Meuer, S.M.; Saaddine, J.B. Prevalence of age-related macular degeneration in the us population. Arch. Ophthalmol. 2011, 129, 75–80.
21. Van Leeuwen, R.; Ikram, M.K.; Vingerling, J.R.; Witteman, J.C.; Hofman, A.; de Jong, P.T. Blood pressure, atherosclerosis, and the incidence of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003, 44, 3771–3777.
22. Klein, R.; Klein, B.E.; Tomany, S.C.; Cruickshanks, K.J. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology 2003, 110, 1273–1280.
23. Grazia D. Femminella, Nicola Ferrara and Giuseppe Rengo. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. Front Physiol. 2015 Feb 12;6:40.
24. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., and Zhang, C.Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. Trends Cell Biol. 22, 125–132. doi: 10.1016/j.tcb.2011.12.001
25. Alexandrov, P.N., Dua, P., Hill, J.M., Bhattacharjee, S., Zhao, Y., and Lukiw, W. J. (2012). microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). Int. J. Biochem. Mol. Biol. 3, 365–373.
26. Giovanni L. Romano, Chiara B. M. Platania. Retinal and Circulating miRNAs in Age-Related Macular Degeneration: An *In vivo* Animal and Human Study. Front Pharmacol. 2017; 8: 168.
27. Anderson P. J., Watts H., Hille C., Philpott K., Clark P., Gentleman M. C., et al. . (2008). Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat. Clin. Ophthalmol. 2, 801–816. 10.2147/OPHTH.S3967
28. Berber P., Grassmann F., Kiel C., Weber B. H. (2017). An eye on age-related macular degeneration: the role of MicroRNAs in disease pathology. Mol. Diagn. Ther. 21, 31–43. 10.1007/s40291-016-0234-z

29. Howlett D. R., Bate S. T., Collier S., Lawman A., Chapman T., Ashmeade T., et al. . (2011). Characterisation of amyloid-induced inflammatory responses in the rat retina. *Exp. Brain Res.* 214, 185–197. 10.1007/s00221-011-2819-4
30. Zhuang Z., Xiao Q., Hu H., Tian S. Y., Lu Z. J., Zhang T. Z., et al. . (2015). Down-regulation of microRNA-155 attenuates retinal neovascularization via the PI3K/Akt pathway. *Mol. Vis.* 21, 1173–1184.
31. Yan L., Lee S., Lazzaro D. R., Aranda J., Grant M. B., Chaqour B. (2015). Single and compound knock-outs of MicroRNA (miRNA)-155 and its angiogenic gene target CCN1 in mice alter vascular and neovascular growth in the retina via resident microglia. *J. Biol. Chem.* 290, 23264–23281. 10.1074/jbc.M115.646950

CAPÍTULO 13. ANEXOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE MEDICINA-CIDOCS



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA: Uso de información personal y clínica, medición antropométrica y toma de muestra de sangre

Estimado(a) Señor/Señora: _____ No registro: _____

Introducción/Objetivo:

El laboratorio de neurociencias del Centro de Investigación Aplicada a la Salud Pública (CIASaP) de la Facultad de Medicina y el Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS), ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Sinaloa, realizan en colaboración el proyecto: *“Caracterización de biomarcadores para Alzheimer en oftalmopatías más comunes en México: Glaucoma y DMRE”*. El objetivo del estudio es caracterizar biomarcadores para Alzheimer (como microRNAs, variantes genéticas polimorfismos, proteínas y otros metabolitos/analitos), presentes en torrente sanguíneo en pacientes con glaucoma y degeneración macular relacionada a la edad (DMRE).

Procedimientos:

Si usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente:

- Proporcionará información personal y clínica, a través de una encuesta. La encuesta consistirá de la siguientes secciones: datos generales, antropometría (resultados de evaluación), hábitos alimenticios, química sanguínea (resultados del análisis de una muestra de sangre), actividad física, consumo de tabaco, consumo de alcohol, nivel socioeconómico, antecedentes patológicos y antecedentes heredo-familiares.
- Se le realizarán mediciones antropométricas con un estadímetro (talla), cinta métrica (circunferencias) y equipo de impedancia eléctrica (para medir %grasa, masa muscular, IMC entre otras); procedimientos que no comprometen su estado de salud y que ayudaran a entender mejor su estado antropométrico con fines de investigación.
- Proporcionará una muestra de sangre periférica (15 mL aproximadamente), distribuida en dos tubos (uno para obtener suero y otro tubo para obtener un paquete celular para obtención de ADN genómico (y plasma). Dicha muestra formará parte de un banco de sueros/plasma y ADN genómico de pacientes; el cual será utilizado para determinar niveles de microRNAs, polimorfismos para Alzheimer/glaucoma/diabetes/DMRE y proteínas biomarcadores de estas enfermedades. Así mismo, el banco antes mencionado será utilizado en este proyecto de investigación, realizado en el laboratorio de neurociencias del Centro de

Investigación Aplicada a la Salud Pública (CIASaP) de la Facultad de Medicina y el Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS), ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Sinaloa. Esto no representa un riesgo adicional para su salud. En el futuro, este estudio podría ayudar a identificar posibles blancos terapéuticos para prevenir o mejorar la calidad de vida de pacientes con Alzheimer/glaucoma/diabetes/DMRE.

Beneficios: Con su participación en esta investigación se le proporcionarán resultados del análisis antropométrico y de química sanguínea. Así mismo, contribuiré con los investigadores responsables en la generación de conocimiento en la búsqueda de biomarcadores para el pronóstico, diagnóstico y posible tratamiento de las patologías antes mencionadas.

Confidencialidad: Toda la información que proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

Riesgos Potenciales/Compensación: Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Si alguna de las preguntas le hiciera sentir un poco incomodo(a), tiene el derecho de no responderla. En la toma de muestra de sangre, puede haber un riesgo mínimo como un pequeño moretón y/o pequeño dolor en el momento de la toma. Se le hace notificar que el material que se utilizará es nuevo y desechable. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.

Participación Voluntaria/Retiro: La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera la forma en cómo le tratan al acudir a su atención médica.

Números a Contactar: Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con el/la investigador/a responsable del proyecto: Dra. Carla Ernestina Angulo Rojo, al siguiente número de teléfono 6671 88 81 . Si usted acepta participar en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

CONSENTIMIENTO PARA SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Su firma indica su aceptación para participar voluntariamente en el presente estudio.

Nombre del participante:

No. Registro: _____ Fecha: ____/____/____ Firma*:

***En caso de incapacidad para firmar, firma del tutor o familiar.**

Nombre Completo del Testigo 1:

Dirección

Fecha: ____/____/____ Relación con el participante _____ Firma:

Nombre Completo del Testigo 2:

Dirección

Fecha: ____/____/____ Relación con el participante _____ Firma:

Nombre de la persona que obtiene el consentimiento:

Fecha: ____/____/____ Relación con el participante _____ Firma:
