

**IDENTIFICACIÓN DE MICRO-ARN ASOCIADOS A ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES
DIAGNOSTICADOS CON GLAUCOMA DE ÁNGULO ABIERTO**

Juliana Andrea Cabrera Perdomo

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales

Biología

2016

**IDENTIFICACIÓN DE MICRO-ARN ASOCIADOS A ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES
DIAGNOSTICADOS CON GLAUCOMA DE ÁNGULO ABIERTO**

Juliana Andrea Cabrera Perdomo

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
PREGRADO EN BIOLOGÍA**

DIRECTOR ANDRÉS O. CASTILLO, PhD

CO-DIRECTOR LEONEL I. MONTEALEGRE, BIOLOGO, ESTUDIANTE PhD

Cali

2016

Aprobado Por:

Evaluador

Evaluador

Director del proyecto

Co- Director del proyecto

Santiago de Cali, Junio 3 del 2016.

CONTENIDO

RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
1. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2. JUSTIFICACION.....	14
3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	14
3.1 Anatomía del ojo.....	14
3.2 Glaucoma.....	16
3.3 Conceptos básicos de los miARN.....	17
3.4 La expresión de miARN como factor de riesgo para el glaucoma.....	18
3.5 Redes de conectividad génica.....	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo General	19
5.2 Objetivos específicos	20
6. METODOLOGÍA.....	20
6.1 Análisis en laboratorio	20
6.1.1 Toma De Muestra	20
6.1.2 Aislamiento del ARN y conversión a ADN Copia	21
6.1.3 Arreglos de PCR para miARN	24
6.1.4 Análisis estadísticos.....	26
6.2 Análisis <i>in silico</i>	26
6.2.1 Determinación del algoritmo de Búsqueda	26
6.2.2 Análisis de los datos obtenidos en GEO.....	26
6.2.3 Construcción de la red génica de asociaciones.....	27
7. Resultados	27
7.1 Resultados de laboratorio.....	27
7.2 Resultados del análisis <i>in silico</i>	28
7.2.1 Algoritmo de búsqueda y análisis con GEO2R	28

7.2.3 Obtención de los genes blanco a partir de una base de datos curada	28
7.3 Obtención de la red de asociaciones de proteínas	30
8. DISCUSIÓN	31
9. CONCLUSIONES	33
10. RECOMENDACIONES.....	34
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35
12. ANEXOS.....	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Matriz de PCR con los miARN asociados con angiogénesis	24
Tabla 2. Genes posiblemente silenciados por miR-92a.....	29
Tabla 3. Genes blanco de miR-92a con sus descripciones	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del ojo humano.....	15
Figura 2. Protocolo de aislamiento de ARN total usando el PaxgeneBlood RNA-kit.	22
Figura 3. Conversión de los ARNm maduros a ADNc y posterior detección	23
Figura 4. miScript PCR array: para miARN maduros reportados por regular angiogénesis.....	25
Figura 5. Porcentajes de detección de los miARN asociados con la regulación de procesos angiogénicos.	28
Figura 6. Red génica de la vía de señalización asociada con angiogénesis	32

LISTA DE ANEXOS

I.	Acta de aceptación del comité de ética	32
II.	Tabla de los artículos usados en el GEO	33
III.	Tabla de los genes de baja expresión usados.....	34

ABREVIATURAS

POAG: Glaucoma primario de ángulo abierto (del inglés *Primary Open-Angle Glaucoma*)

MT: Malla Trabecular

ME: Matriz Extracelular

PIO: Presión Intraocular

RGCs: Células ganglionares de la retina (del inglés *Retinal Ganglio Cells*)

ADNc: ADN copia

ARNm: ARN mensajero

miARN: micro ARN

LogFC: Cambio logarítmico de la expresión de los genes (del inglés *Fold Chance*)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

GEO: *Gene Expression Omnibus*

NCBI: centro nacional de información biotecnológica (del inglés *National Center for Biotechnology Information*)

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mis padres por todo su apoyo, amor y comprensión durante este proceso académico y a mi familia por estar siempre presente con su amor.

Al Dr. Andrés Castillo por su paciencia y compromiso con el arte de enseñar la ciencia y por permitirme participar en este proyecto.

A Leonel I. Montealegre por su paciencia y colaboración a lo largo del proyecto.

A Laura Rodríguez por su colaboración y enseñanza en el laboratorio.

A los Dres. Carlos Valderrama y Leonardo Herrera por sus enseñanzas y acompañamiento en el proceso académico.

A mis padres por todo su apoyo, amor y comprensión durante este proceso académico y a mi familia por estar siempre presente con su amor.

Y finalmente a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a mi crecimiento académico y personal.

RESUMEN

El glaucoma es una enfermedad caracterizada por la pérdida progresiva de células ganglionares de la retina (y sus axones, que da como resultado defectos del campo visual posterior y pérdida de la visión. Los miARN tienen un papel importante en el glaucoma, ellos participan en el control de la formación de la matriz extracelular del ojo. Igualmente, los miARNs son importantes en la angiogénesis donde fallas en este proceso biológico se puede asociar con un flujo incorrecto de sangre hacia las capas de la retina del ojo y hacia la cabeza del nervio óptico generando isquemia, y por lo tanto, afectando las células de la retina.

En el reciente estudio se identificó los miARN asociados con la angiogénesis presentes en muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con POAG, como los genes diana para los miARN asociados con la angiogénesis detectados y con la información obtenida se construyó una red génica de asociaciones.

En total fueron analizadas por arreglos de PCR la presencia de 20 moléculas de miARN asociados con angiogénesis en 12 muestras de sangre periférica, identificando la presencia de ocho de los 20 en los seis pacientes diagnosticados con Glaucoma. El miR-92a-3p se detectó solo en las muestras de pacientes diagnosticados con POAG pero no en los participantes aparentemente sanos control. Además, se identificaron 23 genes diana para miR-92a-3p de un total de 927 genes con baja expresión en pacientes diagnosticados con POAG. El análisis de red génica de asociación señaló una vía de comunicación asociada con angiogénesis conformada por los genes VEGFA, PLCG1, PRKCA, RAF1, MAP2K1 Y MAPK3 en donde la PRKCA es un gen diana para el miR-92a-3p.

Palabras claves: Glaucoma, angiogénesis. Micro ARN. Arreglos de PCR. Redes génicas de asociación.

ABSTRACT

Glaucoma is a disease characterized by the progressive loss of retinal ganglion cell and their axons that resulting in defects in the visual field and vision loss. miRNAs have an important role in glaucoma; they participate in the controlling the formation of the extracellular matrix of the eye. Similarly, miRNAs are important in angiogenesis in where fails in this biological process it may be associated with improper blood flow to the layers of the retina of the eye and towards the optic nerve head generating ischemia, and therefore affecting retinal cells.

In the present study was identified miRNAs associated with angiogenesis present in peripheral blood samples of patients diagnosed with POAG as well as target genes for miRNAs associated with angiogenesis. From the information obtained gene was constructed a network of associations.

In total were analyzed by PCR arrays 20 miRNA associated with angiogenesis in 12 peripheral blood samples. 8 of 20 miRNAs were identifying in patients diagnosed with Glaucoma. The miR-92a-3p was detected only in samples from patients diagnosed with POAG but not in apparently healthy control participants. Also, from 927 genes with low expression in patients diagnosed with POAG, 23 target genes for miR-92a-3p were identified. The analysis of genetic network association associated with angiogenesis showed a system composed of the genes: VEGF, PLCG1, PRKCA, RAF1, MAP2K3, MAP2K1, in where PRKCA was a target gene for miR-92a-3p

Keywords: Glaucoma, angiogenesis. Micro RNA. PCR arrays. Gene networks of association.

1. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El glaucoma de ángulo abierto primario (POAG, por sus siglas en inglés) es una enfermedad asintomática que hoy en día presenta un gran impacto a nivel mundial según la Organización Mundial para la Salud (OMS), afectando a millones de personas principalmente aquellas mayores de 40 años. Esta enfermedad de carácter degenerativa no tiene cura en estados avanzados, por lo cual es de gran importancia un diagnóstico oportuno y rápido. Se encuentra asociada a alteraciones en el campo visual y relacionado con múltiples factores de riesgo entre los cuales el aumento de la presión intraocular (PIO) es el más importante, así, una profunda comprensión en la etiología del glaucoma ayudará en el diagnóstico, etapas fisiopatológicas y generación de fármacos. (Raghunath & Perumal, 2015).

En los países desarrollados, más del 50% de las personas que padecen la enfermedad no han sido diagnosticadas (Sommer et al., 1991), pero aún más, en países en vías de desarrollo, como el nuestro, se estima que esta falta de diagnóstico podría ser aún mayor, del orden del 60 al 80%. En particular, el problema en Colombia se ha subestimado, en parte por falta de estudios epidemiológicos poblacionales que muestren la magnitud de la situación en grupos de mayor riesgo.

Se ha propuesto que uno de los mecanismos asociados con la etiología del POAG es la expresión aberrante de micro ARN (miARN) asociados a procesos angiogénicos que podrían estar afectando el flujo sanguíneo correcto en las células endoteliales, la retina y el nervio óptico (Venkataraman et al., 2010). Por lo anterior, es necesario investigar si este proceso angiogénico podría ser considerado como un factor de riesgo para POAG.

2. JUSTIFICACION

El glaucoma hace parte de un grupo de enfermedades caracterizadas por la pérdida progresiva de células ganglionares de la retina (RGCs, por sus siglas en inglés) y sus axones, que da como resultado defectos del campo visual posterior y pérdida de la visión. La presión intraocular (PIO) anormalmente elevada es uno de los principales factores de riesgo para la aparición y desarrollo de glaucoma. (Wang et al., 2015).

El glaucoma es una de las principales causas de ceguera mundial. Entre los tipos de glaucoma, el más frecuente es POAG, constituyendo aproximadamente el 60% de todos los casos (Zanón-Moreno et al., 2008). A nivel mundial, se estima que más de 70 millones de personas la padecen, por lo que tiene gran impacto a nivel social, convirtiéndose así en un problema de salud pública. Para Colombia en particular, 3 de cada 100 personas están propensos a sufrir de esta enfermedad, según las cifras de la Asociación Grupo de Trabajo en Glaucoma Colombia (Lozada, 2015). Es importante resaltar que es una enfermedad asintomática y por lo tanto de difícil diagnóstico temprano, no tiene cura y al avanzar la edad los síntomas se hacen más claros pero es mucho más difícil un tratamiento efectivo.

3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 Anatomía del ojo

Un recubrimiento resistente y blanco, llamado esclerótica, protege el ojo. Parte de la esclerótica blanca puede observarse en la parte frontal del ojo. Una membrana transparente y delicada, llamada conjuntiva, recubre la esclerótica (Lozada, 2015). En la parte frontal del ojo se encuentra la córnea. La córnea es la parte transparente del recubrimiento protector del ojo. Permite el ingreso de luz al ojo. El iris es la parte coloreada del ojo que se encoge y expande para que la pupila pueda permitir el ingreso de la cantidad correcta de luz al ojo. La pupila dirige la luz al cristalino. El cristalino enfoca la luz sobre la retina (dentro del recubrimiento del ojo). Las fibras nerviosas de la retina transportan las imágenes al cerebro a

través del nervio óptico (Lozada, 2015). La parte frontal del ojo contiene un líquido transparente llamado líquido intraocular o humor acuoso, producido por el cuerpo ciliar. El líquido fluye hacia el exterior por la pupila. A continuación, es absorbido en el torrente sanguíneo a través del sistema de drenaje del ojo (Lozada, 2015).

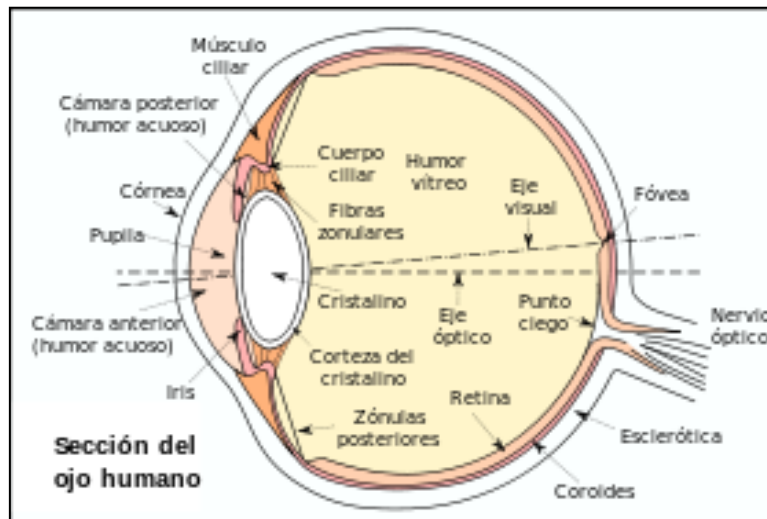


Figura 1. Anatomía del ojo humano. Se muestra las partes del ojo y las tres tunicas de disposición concéntrica. La capa exterior (fibrosa) compuesto de la esclerótica y la córnea; úvea o túnica vascular la cual comprende la corioidea, el cuerpo ciliar y el iris y por último, la capa interna nerviosa (fotosensible) integrada por la retina, que se comunica a través del nervio óptico hasta el cerebro. (Tomado de *Glaucoma Research Foundation*).

Este sistema de drenaje es una malla de canales de drenaje que se encuentran alrededor del borde exterior del iris. Un drenaje adecuado ayuda a mantener la presión ocular en un nivel normal. La producción, el flujo y el drenaje de este líquido constituyen un proceso continuo y activo, necesario para la salud del ojo.

La PIO depende de la cantidad de líquido que se encuentre en el ojo. Si el sistema de drenaje del ojo funciona correctamente, es posible drenar el líquido y evitar una acumulación. Del mismo modo, si el sistema de producción de líquido del ojo funciona correctamente, se producirá la cantidad adecuada de líquido para un ojo saludable. Su PIO puede variar en distintos momentos del día, pero normalmente se mantiene dentro de un margen que el ojo puede controlar (18 mmHg aproximadamente) (Lozada, 2015).

3.2.1 Glaucoma

El glaucoma es un grupo heterogéneo de neuropatías ópticas y es la principal causa de ceguera irreversible en el mundo. El POAG es la forma más común de glaucoma, y es caracterizado por la lenta progresión de una atrofia en el disco óptico, con una correspondiente pérdida del campo visual periférico y una apariencia excavada en el disco óptico (Quigley et al., 1997). Se ha estimado que aproximadamente 80 millones de personas en el mundo serán afectadas por la enfermedad para el año 2020 (Omar, 2012).

Algunos de los factores de riesgo que contribuyen a glaucoma han sido identificados y estos incluyen; la edad, antecedentes familiares, la PIO elevada, daño del nervio óptico existente, histéresis reducida corneal, la miopía, la diabetes y pseudoexfoliación (Coleman., 2008). En el glaucoma, la degeneración del nervio óptico comienza en la periferia y avanza hacia el centro resultando en una apariencia excavado.

El humor acuoso se produce por la secreción de los cuerpos ciliares que se drena a través de la malla trabecular (MT) y una pequeña porción (10%) por vía uveoescleral. Un equilibrio entre la entrada y la salida del humor acuoso determina los niveles de PIO. El flujo excesivo o la obstrucción en el drenaje del humor acuoso a través del ángulo iridocorneal (región yuxtacanalicular o malla trabecular / canal de Schlemm) conduce a la elevación de la PIO que puede causar daño al nervio óptico. La relación exacta entre la PIO elevada y glaucoma se entiende de manera incompleta (Chen et al., 2011).

La retina es un tejido en capas en la parte posterior del ojo que contiene las células foto receptoras especializadas llamadas bastones y conos, así como otros tipos de células, incluyendo las ganglionares, bipolares, horizontales, y las células amacrinas. Su desarrollo, mantenimiento y funciones visuales sensibles a la luz están muy regulados (Zhu et al., 2011). Las células ganglionares de la retina (por sus siglas en inglés RGCs) son un grupo de neuronas sensoriales especializadas en el sistema nervioso central, localizadas en la capa interna de la retina. En pacientes con glaucoma, el incremento en la presión

intraocular daña los cuerpos de las células así como los axones, resultando en una permanente e irreversible ceguera. La degeneración de la retina en pacientes con glaucoma es a menudo acompañada por apoptosis de RGCs la cual puede ser causadas por exocitotoxicidad, hipoxia o estrés oxidativo (Kong et al., 2014).

3.3 Conceptos básicos de los miARN

Los micro ARN (miARN) son una clase de pequeños ARN no codificantes (19-25 nucleótidos) que se encuentran en las plantas y los animales, que regulan negativamente la expresión génica (Chen et al., 2011). Los miARN genes pueden ser intergénicos o intragénicos. Los miARN intergénicos se han encontrado en los intrones de proteínas y genes que no codifican proteínas y en los exones de transcritos largos no codificantes y por lo general su expresión está regulada junto con la de sus genes de acogida (Rodríguez et al., 2004).

Los miARN intergénicos se cree que son transcritos de forma independiente de otros genes y pueden ser localizados en grupos que generan unidades policistrónicas que contienen múltiples bucles de los cuales los miARN maduros se procesan. Los promotores que regulan la expresión de estos miARN han demostrado tener algunas similitudes en sus motivos con los promotores de otros genes transcritos por la ARN polimerasa II tales como los genes de codificación de proteínas (Xie et al., 2005). Actualmente, se cree que el genoma humano codifica más de 1000 miARN y cada vez hay más pruebas que sugieren que juegan un papel crítico en muchos procesos biológicos clave, como el crecimiento celular, la diferenciación de los tejidos, la proliferación celular, el desarrollo embrionario, y la apoptosis (Esquela-Kerscher et al., 2006). Estudios en ratones mutantes han mostrado por ejemplo que el grupo miR-183/96/182 y miR-132/212 fueron esenciales para el desarrollo sináptico de la retina y el miR-124 fue crítico para la maduración de los conos celulares en la retina (Kong et al., 2014).

3.4 La expresión de miARN como factor de riesgo para el glaucoma

En 2014 un estudio reportó que los miARN tienen un papel importante en las enfermedades oculares y dentro de ellas se encuentra el glaucoma en donde estas moléculas participan en la patogénesis de la enfermedad de forma directa e indirecta (Raghunath & Perumal, 2015). Los miARN participan en el control de la formación de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) (Raghunath & Perumal, 2015). Se ha reportado que la expresión aberrante de miR-183 altera la expresión de integrina- β afectando la fisiología de la malla trabecular (MT) y por lo tanto aumentando el riesgo de padecer glaucoma (Yan et al., 2012). Además, se ha reportado que la familia del miR-29 regula la expresión de la ECM en la MT llevando a cambios en la presión intraocular (Luna et al., 2009). Los miARN también juegan un papel importante en la angiogénesis para la proliferación, la migración y maduración de las células endoteliales (Venkataraman et al., 2010). En la enfermedad del POAG, fallas en la angiogénesis se puede asociar con un flujo incorrecto de sangre hacia las capas de la retina y hacia la cabeza del nervio óptico generando isquemia, y por lo tanto, afectando las células de la retina evitando un campo visual adecuado. (Venkataraman et al., 2010).

3.5 Redes de conectividad génica

La red de interacción es una manera más precisa para representar la información de las listas de genes o vías, ya que describe qué genes están estrechamente relacionados dentro de una vía determinada. Por lo tanto, tiene el potencial de detectar las señales más sutiles, tales como perturbaciones locales dentro de las vías conocidas, así como dentro de vías que aún no han sido descritos (Nacu, Critchley-Thorne, Lee, & Holmes, 2007). Una red funcional reportada que exhibe la expresión génica diferencial en el glaucoma, es la neuroinflamación en particular la cascada complementaria. Este cambio en esta vía funcional es evidente tanto en la cabeza del nervio óptico y la retina, y representa uno de los primeros cambios detectados en ambos tejidos, incluso antes de evidenciar la patología celular. (Nacu, Critchley-Thorne, Lee, & Holmes, 2007)

El paradigma genético ha cambiado porque ahora sabemos que la información de las características fenotípicas del organismo, además de estar contenida explícitamente en la secuencia de bases de cada gen, también está contenida en la topología de la red genética (cómo están conectados los genes) y en su dinámica (qué genes se expresan en determinado momento) (González, 2007). Además, se pueden presentar no solo interacciones físicas entre proteínas sino entre proteínas-genes. Los genes interactúan unos con otros a través de las proteínas reguladoras (factores de transcripción) que generan. Los factores de transcripción se unen de forma específica a las regiones reguladoras de los genes, activando o reprimiendo su expresión. Esta serie de interacciones, mediadas por los factores de transcripción, da lugar a una red dirigida en la que dos genes están “conectados” si la expresión de uno regula, positiva o negativamente, la expresión del otro (González, 2007).

4. HIPÓTESIS

Ho: La expresión de miARN asociados a la angiogénesis es igual entre pacientes diagnosticados con POAG y personas sanas.

Ha: La expresión de miARN asociados a la angiogénesis es diferente entre pacientes diagnosticados con POAG y personas sanas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Identificar los miARN asociados con la angiogénesis presentes en muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con POAG.

5.2 Objetivos específicos

- Detectar la presencia de miARN asociados con la angiogénesis en muestras sangre periférica de pacientes diagnosticados con POAG.
- Identificar los genes diana para los miARN asociados con la angiogénesis detectados en muestras sangre periférica de pacientes diagnosticados con POAG.
- Construir una red génica de asociaciones de genes diana para los miARN asociados con la angiogénesis detectados en muestras sangre periférica de pacientes diagnosticados con POAG y sus genes dianas.

6. METODOLOGÍA

6.1 Análisis en laboratorio

6.1.1 Toma De Muestra

Para el análisis de laboratorio se tomaron 12 muestras de sangre periférica por punción venosa (2,5 ml) de seis pacientes diagnosticados con PAOG y seis participantes aparentemente sanos como grupo control. La sangre fue almacenada en tubos Vacutainers® Plus K2 EDTA y refrigerada a -4°C hasta el momento de su procesamiento. La toma fue realizada por una enfermera con amplia experiencia para el procedimiento. El presente trabajo de grado hace parte del estudio titulado “Prevalencia de Glaucoma en pacientes hipertensos y diabéticos en seis ciudades de Colombia” con acta de aprobación ética 05-014 del comité institucional de ética humana de la Universidad del Valle (Anexo I).

Los criterios de inclusión de los pacientes participantes del estudio fueron los siguientes: firmar un consentimiento informando en donde aceptaba participar en el estudio y ser mayor de 50 años. Conjuntamente, como criterios de exclusión se consideraron: presentar co-morbilidades asociadas graves (insuficiencia renal, falla cardíaca congestiva, apnea del sueño, enfermedades autoinmunes con

terapia biológica); cirugías oftalmológicas intraoculares previas (Ej.: cirugía de cataratas, por trauma, desprendimiento de retina, degeneración macular o maculopatía); patologías oculares congénitas (Ej.: coloboma) y pacientes con alteraciones cognitivas que no le permitan comprender el consentimiento informado.

6.1.2 Aislamiento del ARN y conversión a ADN Copia

El aislamiento del ARN total se realizó utilizando el PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, # 762174) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 2).

Para el aislamiento del ARN se centrifugaron los tubos de Vacutainers® Plus K2 EDTA que contenían las muestras de sangre periférica y se retiró el sobrenadante por decantación, se añadió agua libre de RNasa al pellet, y posteriormente, para disolver el pellet se agitó el tubo y mediante centrifugación se desechó el sobrenadante. Luego, se añadió una solución tampón de resuspensión y se agitó para disolverlo totalmente. El pellet resuspendido se incubó con proteinasa K en tampones optimizados para digerir las proteínas. Se centrifugó de nuevo a través de una columna *PAXgeneShredder spin column* para homogeneizar el lisado celular y eliminar los restos celulares, y se transfirió el sobrenadante de la fracción eluida a un tubo de microcentrífuga limpio.

Se añadió etanol para ajustar las condiciones de unión y se deposita el lisado en una columna *PAXgene RNA spin column*. Durante una breve centrifugación el ARN se unió selectivamente a la membrana de *silicagelPAXgene* mientras los contaminantes la atraviesan, el resto de contaminantes se eliminan en varios pasos eficaces de lavado. Entre el primer y el segundo paso la membrana se trata con DNasa I para eliminar los restos de ADN ligado.

Después de los pasos de lavado, el ARN se eluyó en una solución tampón de elución y se desnaturalizó por calor. Una vez purificado el ARN, se cuantificó su concentración y pureza utilizando un espectrofotómetro nanodrop empleando 1 µl del ARN aislado.

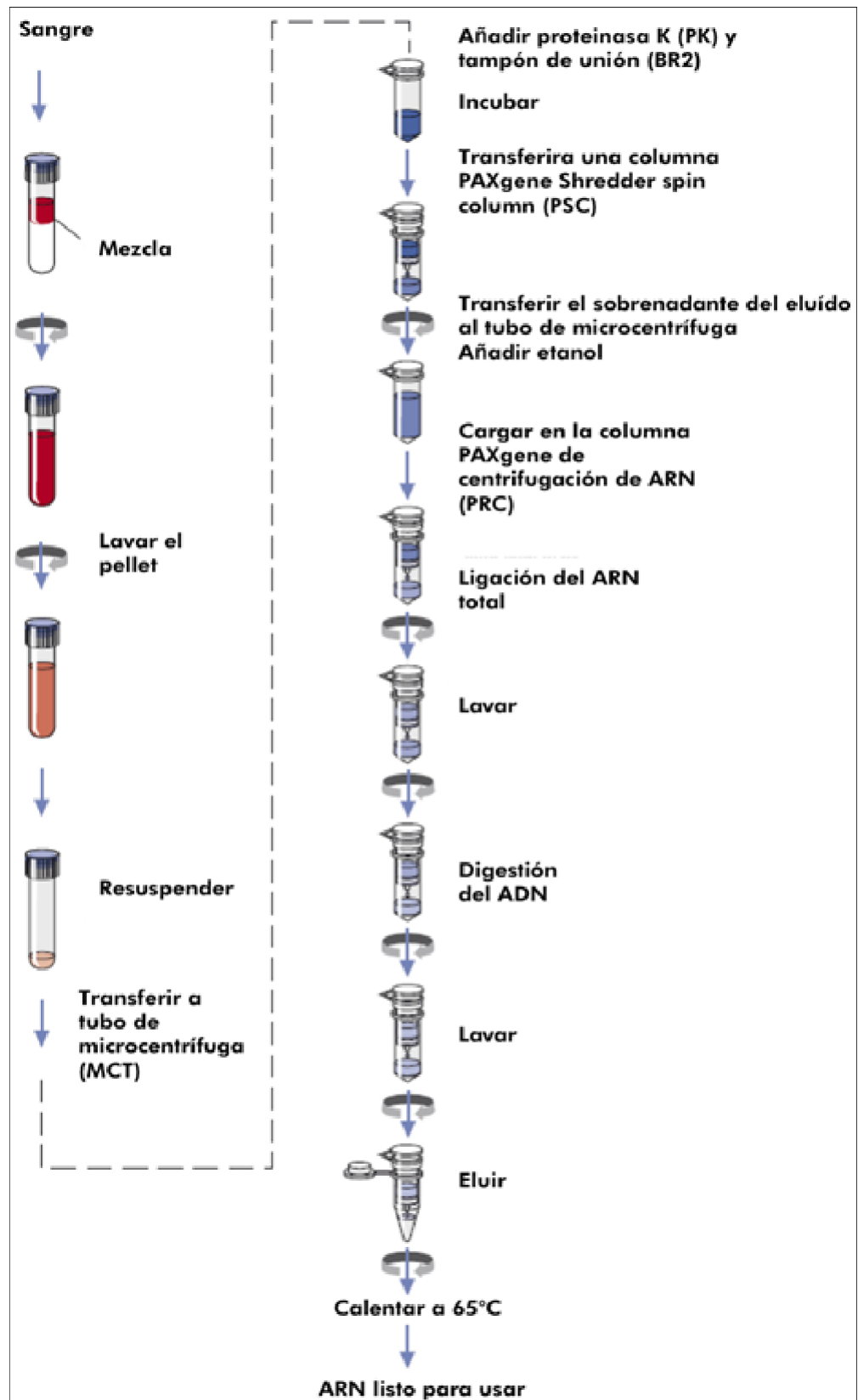


Figura 2. Protocolo de aislamiento de ARN total

Posteriormente, siguiendo las especificaciones del fabricante, se utilizó un miScript II RT Kit (Qiagen, # 218161;) para los experimentos de transcripción reversa (RT-PCR) (Figura 3).

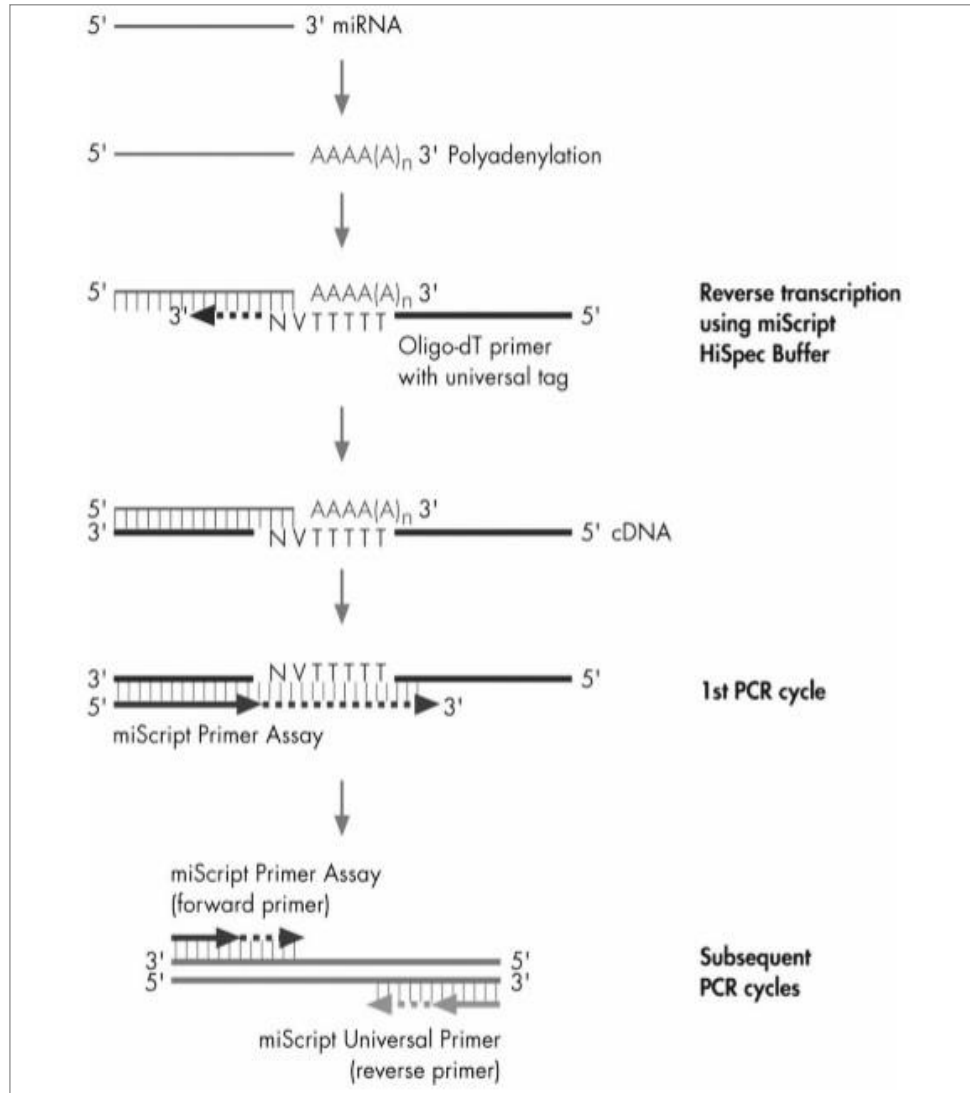


Figura 3. Conversión del ARN a ADNc y posterior detección. El extremo 3' es poliadenilado, lo cual sirve para que un cebador oligo-dT se le una y permita a la polimerasa reversa realizar la conversión.

Una vez las muestras fueron retrotranscritas a ADNc, se depositaron al miScript miRNA PCR array (Qiagen, # 331221-D24;) para su hibridación con el arreglo de PCR diseñado.

6.1.3 Arreglos de PCR

En el presente estudio se utilizó un arreglo de PCR diseñado para identificar secuencias de miARN maduros, validados experimentalmente por regular angiogénesis (Tabla 1).

Tabla 1. Arreglo de PCR con los miARN asociados con la angiogénesis

miARN	No. DE ACCESO	DESCRIPCIÓN
Hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	Anti-angiogénico
Hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	Involucrado en la angiogénesis tumoral
Hsa-miR-20a	MIMAT0000075	Anti-angiogénico
Hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	Pro-angiogénico
Hsa-miR-23a-5p	MIMAT0004496	Pro-angiogénico. Esencial para el desarrollo ocular adecuado
Hsa-miR-27a-5p	MIMAT0004501	Involucrado en el daño del nervio óptico
Hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	Pro-angiogénico
Hsa-miR-100-5p	MIMAT0000092	Pro-angiogénico
Hsa-miR-126-3p	MIMAT0000098	Inhibe la expresión de la molécula de adhesión vascular celular 1 (VCAM-1), que media la adhesión de leucocitos a las células endoteliales.
Hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000445	Pro-angiogénico e hipoxia
Hsa-miR-132-3p	MIMAT0000425	Involucrado en el desarrollo sináptico de la retina
Hsa-miR-143-3p	MIMAT0000426	Involucrado en la regulación de otros genes
Hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	Involucrado en el daño del nervio óptico
Hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	Involucrado en la angiogénesis tumoral
Hsa-miR-210	MIMAT0000267	Promueve la migración de células endoteliales vasculares
Hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	Inhibe el camino para mantener la función vascular de la retina
Hsa-miR-221-5p	MIMAT0004568	Inhibe la migración de las células endoteliales, proliferación y angiogénesis
Hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	Inhibe la migración de las células endoteliales, proliferación y angiogénesis
Hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	Pro-angiogénico
Hsa-miR-378-3p	MIMAT0000732	Involucrado en la supervivencia celular

La técnica de arreglos de PCR combina dos herramientas moleculares: la hibridación con microarreglos, en la que se conocen las secuencias de interés que van a hibridar con la muestra; y el RT-PCR en tiempo real, la cual incrementa la sensibilidad y eficiencia de la detección y permite utilizar pequeñas cantidades de ARN por reacción. Lo anterior presenta grandes beneficios cuando los objetivos experimentales se enfocan en una sola vía de regulación o en un limitado número de genes de interés.

Para la reacción de hibridación y detección por arreglos de PCR se utilizó el miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen, # 218075) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Figura 4).

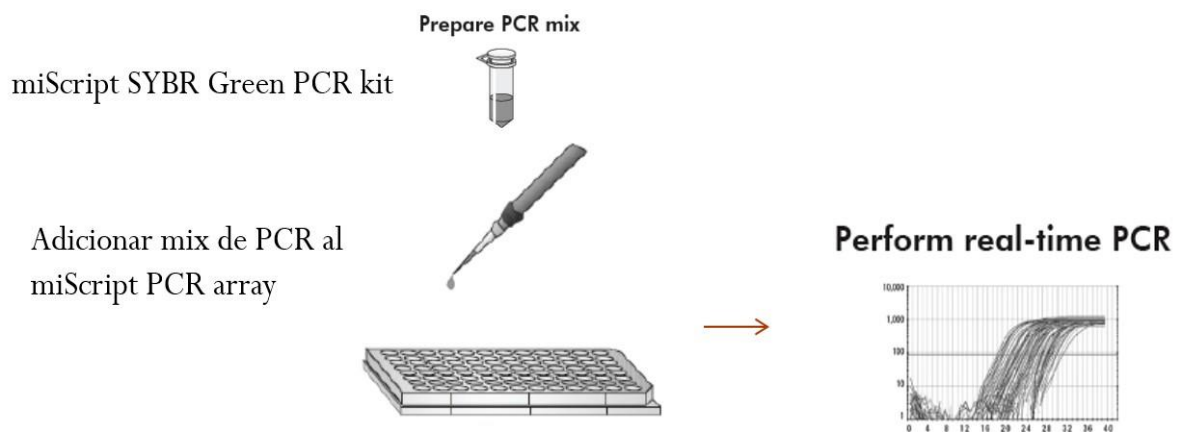


Figura 4. Pasos del procedimiento para la hibridación y detección de los miARN en el arreglo de PCR.

El termociclador utilizado fue un CFX96 (Bio-Rad) del laboratorio de biología molecular del Departamento de Biología de la Universidad del Valle con el siguiente programa de amplificación:

- 1- 10 min a 95°C
- 2- 2- 15 s a 95°C X 40 ciclos
- 3- 3- 1 min a 60°C

6.1.4 Análisis de datos

Se realizó unos análisis descriptivos de los miARN identificados por hibridación en el arreglo de PCR por proporciones utilizando graficas de barra elaboradas por el programa Excel 2013.

6.2 Análisis *in silico*

6.2.1 Algoritmo de Búsqueda

Se construyó un algoritmo de búsqueda con el fin de seleccionar bases de datos publicadas en estudios transcriptomicos del servidor *Gene Expression Omnibus* (GEO) del centro nacional de información biotecnológica (NCBI, por sus sigla en inglés) de los Estados Unidos. El algoritmo empleado fue: "*Glaucoma OR Open-Angle Glaucoma AND tissue AND Trabecular Meshwork OR Optic Nerve OR aqueous humor AND Homo sapiens [porgn: txid9606]*".

6.2.2 Análisis de las bases de datos obtenidos en el GEO

Los criterios de inclusión para la selección de las bases de datos fueron que las poblaciones de los estudios no presentara enfermedades como diabetes e hipertensión, o hayan sido tratada con fármacos. Además, los archivos contenidos en las bases de datos fuesen analizable con el programa GEO2R del servidor GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), el cual compara dos o más grupos de datos transcriptomicos vs un grupo control, con el fin de identificar que genes se encuentran significativamente expresados a la baja o a la alta en un tejido especifico o muestra. Cuatro variables informativas resultantes del analisis con el programa GEO2R fueron consideradas para el estudio: la identificación del gen (ID); el *valor-p*, si era mayor a 0,05; el cambio logarítmico de la expresión de los genes, LogFC menores a 1 o mayores a -1; y el símbolo del gen. La información se almacenos en una hoja de cálculo de Excel.

6.2.3 Construcción de la red génica de asociaciones

Usando el servidor “miRTarBase”, versión 6,1 (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), se obtuvo una lista de genes diana de los miARN detectados experimentalmente en el análisis de laboratorio de las muestras de los pacientes diagnosticados con POAG. Esta lista de genes diana se comparó con la lista de genes obtenidas en el análisis con el programa GOE2R (Anexo III). Los genes que concordaron fueron sometidos al programa STRING, versión 10.0 (<http://string-db.org/>), el cual genera redes génicas de asociación, y de esta forma poder determinar, alguna vía de señalización asociada con angiogénesis que posiblemente estaría involucrada con la fisiopatología del POAG.

7. Resultados

7.1 Del análisis de laboratorio

En total fueron analizadas por arreglos de PCR la presencia de 20 moléculas de miARN asociados con angiogénesis en 12 muestras de sangre periférica, identificando la presencia de 8 de los 20 en los 6 pacientes con POAG. Los miARN detectados fueron: hsa-miR-16-5p en 3 de 6 muestras (50%); hsa-miR-126-3p en 3 de 6 muestras (50%); hsa-miR-20a-5p en todas las muestras (100%); hsa-miR-130a-3p en 3 de 6 muestras (50%); hsa-miR-16-5p en 3 de 6 muestras (50%); hsa-miR-143-3p en 3 de 6 muestras (50%); hsa-miR-27a-5p en 3 de 6 muestras (50%); y hsa-miR-92a-3p en todas las muestras (100%). Por su parte, en las 6 muestras control se detectó: hsa-miR-20-5p en 3 de 6 muestras (50%); hsa-miR-130-3p en todas las muestras (100%); hsa-miR-222-3p en todas las muestras (100%); y hsa-miR-143-3p en 3 de 6 muestras (50%), como se observa en la figura 5. De los resultados obtenidos se observa que el miR-92a-3p se detectó solo en las muestras de pacientes diagnosticados con POAG pero no en los participantes aparentemente sanos control (figura 5). Por el contrario, el miR-222-3p no se detectó en las muestras de pacientes diagnosticados con POAG pero si en los participantes aparentemente sanos control.

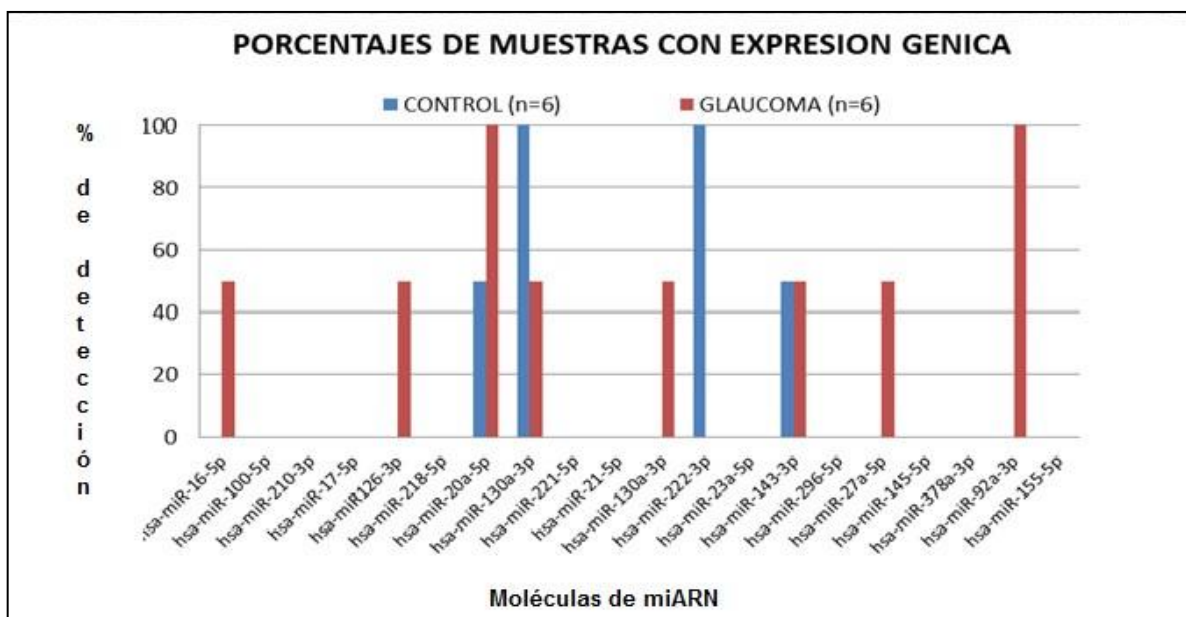


Figura 5. Porcentajes de detección de los miARN asociados angiogénesis. En la gráfica se observa la identificación cualitativa de los miARN en 12 muestras de sangre periférica, de las cuales 6 pertenecen a pacientes diagnosticados con POAG y 6 de participantes aparentemente sanos. En el eje Y se muestra el porcentaje de detección, mientras que el eje X representa los miARN evaluados.

7.2 Del análisis *in silico*

7.2.1 Total de archivos seleccionados

De un total de 271 bases de datos, se seleccionaron cinco que cumplieran con los criterios de inclusión en sus archivos (Anexo II). Al realizar el análisis de expresión de ARNm en muestras de pacientes diagnosticados con POAG vs grupo control con el programa GEO2R, se encontró un número total de genes con cambios logarítmicos significativos en 2210, donde 927 genes presentaban con baja expresión y 1283 alta expresión con una $p < 0,05$ y $> 1 \text{ Log FC} > -1$. (Anexo III)

7.2.2 Identificación de los genes diana para miR-92a-3p

Se identificaron un total de 1643 genes diana para el miR-92a-3p. Al realizar la comparación con los genes con baja expresión encontrados en la interfaz *Genome Expression Omnibus* (GEO por sus siglas en inglés) para pacientes diagnosticados con POAG, se encontró concordancia en 38 genes (Tabla 2).

Tabla 2. Genes posiblemente silenciados por miR-92a-3p

Genes Blanco.	
ANKH	Regulador de transporte inorgánico de pirofosfato
ASS1	Arginina succinate sintasa 1
ATP2B4	ATPasa de transporte de Ca ²⁺ de la membrana plasmática tipo 4
BAHCC1	Dominio y espiral de la bobina que contiene 1
BMP8A	Proteína morfogénica del hueso 8a
CEP85	Proteína centrosomal 85kDa
E4F1	Factor de transcripción 1
EPB41L3	Proteína de membrana de eritrocitos banda 41- tipo 3
HBB	Beta hemoglobina
IGF1R	Receptor del factor de crecimiento de insulina tipo 1
KANK2	Motivo KN And Dominios repetidos de Ankirina 2
KDM6B	Demetilasa 6B específica de la lisina
KIF1A	Miembro de la familia de quinesina 1A
KIFC1	Miembro de la familia de quinesina C1
MAU2	Factor de cohesión de la cisteína Hermana
MEN1	Múltiple neoplasia de endocrina 1
MLLT4	Mieloide/ linfoide o leucemia de linaje mixto de translocación 4
NR1H4	Subfamilia Nuclear del Receptor 1 Grupo H, Miembro 4
PLXNA3	Plexina A3;
PRKCA	Proteína quinase C, Alfa
RASA3	Activador de proteína Ras 3
RASAL2	Activador de proteína Ras tipo 2
RP2	Retinitis Pigmentosa 2 (ligado al X recesivo)
SAP30	Proteína de Asociación Sin3A , 30kDa
SCD	Estearoil-CoA desaturasa
SELENBP1	Proteína de unión a selenio 1
SIK1	Quinasa 1 inducible por sal
SOCS5	Supresor de la señalización de citoquinas 5
STK4	Quinasa 4 de serina / treonina
STMN3	Estatimina tipo 3
SV2A	Glicoproteína de la vesícula sináptica 2A
TACC1	Acida espiral de la bobina que contiene la proteína 1
TANC2	Tetratricopeptidos repetidos
TBL1X	Transducina tipo beta ligada al 1-X
TONSL	Proteína reparadora de AND de tipo Tonsok
TUBB2B	Tubulina , Beta 2B Clase IIb
ZMYND8	Dedos de zinc , tipo MYND 8
ZNF174	Proteína de dedos de zinc 174

7.3 Construcción de la red génica de asociación

De los 38 genes diana para miR-92a-3p que presentaron baja expresión al ser sometidos al programa STRING, determinó una red génica de asociación reportada como vía de señalización asociada con angiogénesis, la cual está conformada por los genes VEGFA, PLCG1, PRKCA, RAF1, MAP2K1 Y MAPK3 (tabla 3), en donde la PRKCA es un gen diana para el miR-92a-3p.

Tabla 3. Genes blanco de miR-92a con sus descripciones

GEN	DESCRIPCIÓN
PLCG1	Fosfolipasa C, gamma 1: Media la producción de las moléculas de segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Juega un papel importante en la regulación de las cascadas de señalización intracelular. Se activa en respuesta a la activación mediada por ligando de tirosina quinasa de tipo receptor, tales como PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4. Juega un papel en la reorganización de la actina y la migración celular.
RAF1	V-raf-1 de la leucemia murina viral oncogén homólogo 1: Serina / treonina-proteína quinasa que actúa como un enlace de regulación entre las Ras GTPasas asociadas a la membrana y la cascada de MAPK / ERK, y funciones críticas de enlace de regulación como un interruptor que determina las decisiones del destino celular incluyendo la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la supervivencia y la transformación oncogénica. Su activación inicia una cascada de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK)
MAP2K1	Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno 1: proteína dual quinasa de especificidad que actúa como un componente esencial de la vía de transducción de señales de la MAP quinasa. La unión de ligandos extracelulares tales como factores de crecimiento, citoquinas y hormonas a sus receptores de la superficie celular activa la RAS y esto inicia la activación RAF1.
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial: Este factor de crecimiento induce la proliferación y migración de células endoteliales vasculares, y es esencial tanto para la angiogénesis fisiológica y patológica
PRKCA	Proteína quinasa C, alfa: Activados por calcio, fosfolípidos y diacilglicerol (DAG) dependiente de serina / treonina-proteína quinasa que está implicada en la regulación positiva y negativa de la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación, la migración y la adhesión, la tumorigénesis, la hipertrofia cardíaca, la angiogénesis, la función plaquetaria y la inflamación, por fosforilación de objetivos tales como RAF1, BCL2, CSPG4, TNNT2 / cTNT, o la activación de la cascada de señalización que implica MAPK1 / 3 (ERK1 / 2) y RAP1GAP.

8. DISCUSIÓN

En la enfermedad del POAG, fallas en la angiogénesis se puede asociar con un flujo incorrecto de sangre hacia las capas de la retina y hacia la cabeza del nervio óptico generando isquemia, y por lo tanto, afectando las células de la retina evitando un campo visual adecuado. (Venkataraman et al., 2010). Lo anterior, puede conllevar hacia una muerte celular programada por la falta de oxígeno y nutrientes en las regiones del ojo (Chung et al., 1999). Además, previos estudios han demostrado un papel importante de los miARN en el desarrollo de enfermedades vasculares asociadas con fallas en la angiogénesis al presentarse problemas en el crecimiento y remodelación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes ya que se requiere de una coordinación en la proliferación y migración de las células dentro de los crecientes brotes angiogénicos (Dang et al., 2013). Además, cuando no se presenta la angiogénesis ocurre una acumulación de varios tipos de colágeno como el I, III y IV, importantes para la filtración del humor acuoso lo que conlleva a un aumento de la PIO y por tanto a la progresión del glaucoma. Varios estudios han mostrado que reguladores críticos de la angiogénesis tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor Flt1 aumenta su expresión después de la depleción de la enzima Dicer, la cual se encuentra implicada en la maduración de miARN y cada miARN tiene múltiples objetivos corriente abajo, por lo que se esperaría un gran impacto de Dicer para los procesos biológicos

Los resultados del presente estudio sugieren que se presenta una expresión aberrante de un miARN asociados con angiogénesis en pacientes diagnosticados con POAG. Tal es el caso del miR-92a-3p que fue detectado en seis pacientes glaucomatosos pero no en personas sin glaucoma, a pesar que el número de pacientes es pequeño, el hecho de haber detectado el miR-92a-3p en todas las muestras de pacientes diagnosticados con POAG y en ninguna muestra control nos hace sugerir que este miARN podría estar participando en la etiología de la enfermedad, específicamente participando en la inhibición de la proteína quinasa C alfa (PRKCA) en la vía de señalización para proceso angiogenicos

(figura 6). La inhibición de la expresión de PRKCA por el miR-92a3p, puede disminuir la señal dentro de la células de la retina que induce el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) afectando por esta vía la formación de los vasos sanguíneos (Xu et al., 2008). Importante, la regulación del receptor de VEGF se ha visto comprometido en la vía de la angiogénesis pero en otros estudios estos hallazgos no se han podido corroborar, por lo tanto , regulación de VEGF podría ser un proceso dinámico que depende del tipo de estímulos recibidos (Urbich et al., 2008)

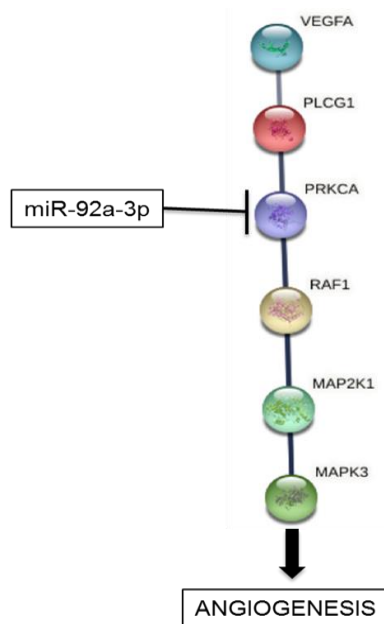


Figura 6. Red génica de la vía de señalización asociada con angiogénesis. El miR-92a3p reconoce e inhibe el ARNm del gen PRKCA lo que posiblemente estaría involucrada con la fisiopatología del POAG.

En el ojo, los elementos celulares de los capilares retinianos están compuestos por dos tipos de células: las primeras son los pericitos responsables de la integridad de la pared vascular; y las segundas son las endoteliales, en las cuales la vía de señalización por PRKCA-VEGF induce angiogénesis (Xu et al., 2008). Los miARN son detectados con alta frecuencia en células endoteliales, y estudios recientes sugieren que regulan los aspectos del desarrollo vascular y la angiogénesis. En las células endoteliales se activa el factor VEGF en respuesta a

la activación de PKC. Igualmente, se ha reportado que el factor VEGF es importante en la remodelación de la matriz extracelular del ojo. En los seres humanos se han identificado cuatro isoformas que son; 121,165, 189, y 206. De las cuales las isoformas 165 y 189 están estrechamente asociadas con la matriz extracelular. (Dang et al., 2013). La matriz extracelular es muy importante para el flujo de sustancias y componente en varias capas del ojo como la lámina cribosa, la cual permite el paso de los vasos sanguíneos hacia la retina.

Así en el presente estudio se propone que el miR-92a-3p es un regulador negativo de la angiogénesis ya que provoca la disminución en la activación de cascadas de señalización involucradas en la proliferación celular, adhesión y angiogénesis por lo cual la activación de RAF1, se verá afectada y consecuentemente disminuyendo la activación de la cascada de señalización MAPK/ERK, Sin embargo, Zhang et al, reporto que la expresión de miR-92a-3p en las células endoteliales puede asociarse con un efecto protector vascular frente al estrés oxidativo, (Zhang et al., 2014), clasificándolo como pro-apoptotico. La anterior discordancia se puede explicar bajo la hipótesis de que en pacientes con glaucoma el miR-92a-3p podría mostrar una expresión aberrante circulando en sangre como un indicativo de fallas en su regulación. Adicionales estudios son necesarios para aclarar el efecto de miR-92a-3p tiene en la etiología del POAG.

9. CONCLUSIONES

La técnica molecular por arreglos de PCR nos permitió determinar la presencia de 8 moléculas de miARN asociados con angiogénesis en 12 muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con POAG, siendo el miR-92a-3p el detectado en el 100% de las muestras. El análisis de red génica de asociación señalo una vía de comunicación asociada con angiogénesis conformada por los genes VEGFA, PLCG1, PRKCA, RAF1, MAP2K1 Y MAPK3 en donde la PRKCA es un gen diana para el miR-92a-3p. Adicionales estudios son necesarios para entender en que otras vías de señalización participan los miARN y como su expresión aberrante se asociación con la etiología del glaucoma.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con los estudios de redes génicas de asociación aplicados a otros procesos biológicos en donde los miARNs pueden estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad del glaucoma.

Analizar en humor acuoso la expresión de miARN en pacientes diagnosticadas con glaucoma para establecer una correlación entre expresión local de estos ARNs pequeños con lo detectado en sangre periférica.

Escalar el análisis molecular a estudios poblacionales con el fin de investigar si los miARN detectados en el presente estudio podrían ser biomarcadores de riesgo para la enfermedad..

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Coleman, A. L., & Miglior, S. (2008). Risk factors for glaucoma onset and progression. *Surv Ophthalmol*, 53 Suppl1, S3-10. doi: 10.1016/j.survophthal.2008.08.006
- Chen, J., Runyan, S. A., & Robinson, M. R. (2011). Novel ocular antihypertensive compounds in clinical trials. *Clin Ophthalmol*, 5, 667-677. doi: 10.2147/opth.s15971
- Dang, L. T., Lawson, N. D., & Fish, J. E. (2013). MicroRNA control of vascular endothelial growth factor signaling output during vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(2), 193-200. doi: 10.1161/atvbaha.112.300142
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(4), 259-269. doi: 10.1038/nrc1840
- González, M. A. (2007). Estructura y dinámica de redes genéticas. *Gaceta Biomédicas*
- Kong, N., Lu, X., & Li, B. (2014). Downregulation of microRNA-100 protects apoptosis and promotes neuronal growth in retinal ganglion cells. *BMC Mol Biol*, 15, 25. doi: 10.1186/s12867-014-0025-1
- Lozada, L. I. (2015). Hablemos del glaucoma from <http://www.glaucocomacolombia.org/glaucoma.php?id=2>
- Luna, C., Li, G., Qiu, J., Epstein, D. L., & Gonzalez, P. (2009). Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Mol Vis*, 15, 2488-2497.
- Nacu, S., Critchley-Thorne, R., Lee, P., & Holmes, S. (2007). Gene expression network analysis and applications to immunology. *Bioinformatics*, 23(7), 850-858. doi: 10.1093/bioinformatics/btm019
- Omar Abou, H. R. (2012). *Estudio de correlación entre función retiniana determinada con perimetría (octopus tg1) y pruebas objetivas en medición de capa de fibras nerviosas (tomografía de coherencia óptica) y cabeza del nervio óptico (tomografía de láser barrido hrt . (Doctorado)*.

- Quigley, H. A., & Vitale, S. (1997). Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(1), 83-91.
- Raghunath, A., & Perumal, E. (2015). Micro-RNAs and their roles in eye disorders. *Ophthalmic Res*, 53(4), 169-186. doi: 10.1159/000371853
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 14(10A), 1902-1910. doi: 10.1101/gr.2722704
- Sommer, A., Tielsch, J. M., Katz, J., Quigley, H. A., Gottsch, J. D., Javitt, J., & Singh, K. (1991). Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol*, 109(8), 1090-1095.
- Urbich, C., Kuehbach, A., & Dimmeler, S. (2008). Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 79(4), 581-588. doi: 10.1093/cvr/cvn156
- Venkataraman, S. T., Flanagan, J. G., & Hudson, C. (2010). Vascular reactivity of optic nerve head and retinal blood vessels in glaucoma--a review. *Microcirculation*, 17(7), 568-581. doi: 10.1111/j.1549-8719.2010.00045.x
- Wang, Y., Huang, C., Zhang, H., & Wu, R. (2015). Autophagy in glaucoma: Crosstalk with apoptosis and its implications. *Brain Res Bull*, 117, 1-9. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.06.001
- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., . . . Kellis, M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434(7031), 338-345. doi: 10.1038/nature03441
- Xu, H., Czerwinski, P., Hortmann, M., Sohn, H. Y., Forstermann, U., & Li, H. (2008). Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc Res*, 78(2), 349-355. doi: 10.1093/cvr/cvm085
- Yan, D., Dong, X. D., Chen, X., Yao, S., Wang, L., Wang, J., . . . Tu, L. (2012). Role of microRNA-182 in posterior uveal melanoma: regulation of tumor

development through MITF, BCL2 and cyclin D2. *PLoS One*, 7(7), e40967.
doi: 10.1371/journal.pone.0040967

- Zanón-Moreno, V. C., & Pinazo-Durán, M. D. (2008). Impacto de los biomarcadores en el glaucoma primario de ángulo abierto. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 83, 465-467.
- Zhang, L., Zhou, M., Qin, G., Weintraub, N. L., & Tang, Y. (2014). MiR-92a regulates viability and angiogenesis of endothelial cells under oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 446(4), 952-958. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.035
- Zhu, Q., Sun, W., Okano, K., Chen, Y., Zhang, N., Maeda, T., & Palczewski, K. (2011). Sponge transgenic mouse model reveals important roles for the microRNA-183 (miR-183)/96/182 cluster in postmitotic photoreceptors of the retina. *J Biol Chem*, 286(36), 31749-31760. doi: 10.1074/jbc.M111.259028

12. ANEXOS

I. Acta de aceptación del comité de ética

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud



ACTA DE APROBACIÓN N° 05-014

Proyecto: **PREVALENCIA DE GLAUCOMA EN PACIENTES CON HIPERTENSIÓN Y DIABETES EN 6 CIUDADES DE COLOMBIA**

Sometido por: **ALEXANDER MARTINEZ/CARLOS RIVERA/ANDRES CASTILLO/FABIAN MENDEZ/NATHALIE ABRAHAMS**

Código Interno: **030-014** Fecha en que fue sometido: **25** **02** **2014**

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité **certifica** que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- | | | | |
|-------------------------------------|--|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Resumen del proyecto | <input checked="" type="checkbox"/> | Protocolo de investigación |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Formato de consentimiento informado | <input checked="" type="checkbox"/> | Instrumento de recolección de datos |
| <input type="checkbox"/> | Folleto del investigador (si aplica) | <input checked="" type="checkbox"/> | Cartas de las instituciones participantes |
| <input type="checkbox"/> | Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

SIN RIESGO RIESGO MÍNIMO RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

- Que las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
- La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.
- Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
- Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
 - Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
- Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
 - Lesiones a sujetos humanos.

II. Artículos encontrados en el GEO usados para el estudio.

No DE ACCESO	Artículo	Autor	Año de publicación	Caso Glaucoma	Caso Control
Series GSE9944	Gene expression data on human optic nerve head astrocytes in Caucasian and African americans with or without glaucoma	Lukas TJ, Miao H, Chen L, Riordan SM et al.	2008	13	6
Series GSE9963	Gene expression data on human optic nerve head astrocytes	Lukas TJ, Miao H, Chen L, Riordan SM et al.	2008	13	6
Series GSE7144	TGF-beta1 and 2 treatment of human trabecular meshwork cells	Russell P	2007	4	2
Series GSE27276	Genome-wide Expression of Trabecular Meshwork in POAG	Liu Y, Allingham RR, Qin X, Layfield D et al.	2013	19	17
Series GSE45570	An Investigation of Global Gene Expression Patterns in Glaucoma and Ocular Hypertension Derived Optic Nerve Heads	Ahram DF, Cook AC, Young KH, Kuehn MH	2013	6	6

III. Lista de genes con baja expresión según las bases de datos del GEO procedentes de muestras obtenidas de pacientes diagnosticados con POAG.

	Valor p				
	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04
Nombre o Código ID del Gen	ANKH	STAT1	BRD7P3	MYH3	ECE1
	C1QTNF3	CDC25C	FLT1	NM_001195470	FGFR1
	TNFRSF25	PCDH1	ASB8	STAC	NOL6
	MXRA8	RPS6KA2	CFI	SELENBP1	IGSF3
	OLFML1	HIP1	MS4A1	MLLT4	MYH11
	CLEC11A	ATP2B4	CDC42EP4	NM_014373	GSTT1
	EPDR1	IFIT2	TENC1	TAS2R4	HSPB2
	AMIGO2	GGTLC2	ATP9B	PLAGL2	GMDS
	MMP11	NR_033787	IRF9	NFX1	ABCA8
	FRY	INPP4A	RCAN2	GSE1	ADA
	ZDHHC14	OSGIN2	AF063608	FANCA	CUZD1
	COCH	PTGIR	NM_152565	PITPNM1	DUSP6
	NEB	FAM162A	RTP4	CSRP2	POLR3G
	BMP1	NM_004984,AB290174	NM_004102	VWA5A	FABP3
	FRY	ATP6V0E2	MEG3	POU5F1P4	ASAP1
	SLC12A2	ITGA3	PTPRT	C11orf16	PCSK7
	CRIP2	HMGA1	RNF141	MLIP	GBP2
	CYFIP2	LYPD1	SNTB1	FOSL1	CALM3
	FRZB	PRKAB2	CA12	TMOD1	TPST2
	ITGB5	RPS17	GTPBP3	SYT17	SLC17A3
	TEK	MICAL2	ZNF174	PTGS1	NM_001024647
	HLA-DMB	FANCI	TET3	NM_013230	NM_019098
	SELENBP1	KDM5D	CA12	CEP72	ABC8
	AQP1	IGFBP2	PTN	WNT2B	STK32B
	SV2A	SEMA3A	SVIL	CYB5A	NFIL3
	ID3	BAHCC1	NM_001166373	PTGDS	CAT
	CSPG4	MAOA	CCDC28A	HSPA2	MED18
	CHST15	TESC	NKX3-2	PUS3	NM_005459
	WWP2	TMEM97	PROS1	CDKL2	TANC2
	PLXNA3	TNFSF4	HPCAL1	FOXE1	AKAP13
	DMPK	COL8A1	CA12	FAIM3	BCL3
	INHBA	COBLL1	BMP8A	ITSN1	MGP
	PLA2G15	MLPH	SMAD3	LTBP4	PURA
	LAMA5	CYB5A	NM_001740	FOS	GZMB
	CDH2	MAP7	TUBB2B	SLC15A2	ETV1
	FZD7	COL14A1	AP3S2	CDH13	BRINP1
	VIM	ADCY3	SYNC	ZNF423	GPRASP1
	ABCB4	PSTPIP1	CRYL1	PXMP2	SLC25A30
	PDK1	ALDH3B1	C2CD2	GSG1	SNORA21
	OPCML	LINC00341	ADRB3	CSF1	KHK
	PTGER1	MAP3K5	MID1	TACC1	VEGFA
	PLEK	TIPRL	NM_020116	CITED2	NAPA
	SMTN	OASL	PARVB	CC2D1A	MAU2
	STAT1	PKNOX1	LEPREL1	LOC100287590	HADH
	ACAN	CRYM	RSL1D1	RARRES1	MMP23A
	PGK1	GRP	KLHL9	EGFR	IFITM2
	SYNE2	EXOC3	MIIP	PDE5A	BRE
	ITGA6	PDE1A	JADE2	MAP2K3	RSL1D1
	ABCB9	FLCN	CARF	IFI35	AIP
	STAT4	HAUS5	IL13RA2	PRSS50	EXOSC7
CALM1	RTN1	QPRT	B9D1	MOCS1	
CSPG4	OTOF	DLG4	HEY1	ITIH1	
HPSE	TTC38	HDAC5	SETD4	THBS1	
GMPR	NOL12	COX15	NM_001005241	ID2	
HIST1H2BM	ARL4C	TONSL	XPA	ZXDC	
ITGA6	ALDH3A2	PTPRZ1	NOS1	DPYSL2	
CD28	CXCL8	IGHV4-31	NM_001563	SIRT2	
PVR	DDX54	RORB	MTMR4	CASP1	
GAS1	CKS1B	C19orf66	EPN1	VENTXP1	
NIPAL3	SCEL	IQSEC1	PLCL2	GRK5	
ADCK4	MEN1	TEX41	SPRY4	ITGB1BP2	
NM_206880	PLK4	GNA12	PLEC	GPX1	
IFITM1	ACVR2B-AS10	IFITM1	ALDH5A1	SULT1A1	

SLIT3	SAMHD1	NES	ADH5	SNCG
SNED1	ZDHHC11	DYNC1LI1	ZMYND8	ADRBK2
PSMB9	OLFML1	ALDH7A1	LRRRC48	CA10
RGS16	ATP2B4	ADCY9	RRN3P1	PDE6G
THBD	NMT2	MRPL4	PAK2	PDE4DIP
HSD11B1	VASH2	MYOZ2	CADM4	DNAJC8
RGS5	MKRN1	NM_001142801	DLK2	NM_014410
RARG	GPD1L	SNCA	KIF1A	EMID1
STAT1	GP2	SIKE1	PVT1	TPD52L1
TRIOBP	ELN	ECI2	SLC6A5	NM_015957
CD302	PRKCA	HCLS1	SIK3	UROD
NR1H4	ELL	LSM3	ABCC4	CCNF
RGS5	STK4	LCAT	PTN	HOOK2
INA	MALL	C1orf54	LEPR	BDKRB2
BNIP3	ALDH1A3	ZSWIM8	MTA1	CD6
PPP1R12B	CHD3	C14orf159	LPHN3	RNASET2
PDGFA	CKM	SRC	sep-09	NM_016247
SIK2	SERPINE1	CMTR1	PDLIM7	SFTPC
UBE2L6	CEP104	HEBP1	MS4A5	HAUS5
KNG1	CNGA3	VGLL1	PCDH9	IL21
TNFAIP8	RARRES3	CASP1	FARS2	RND1
CTSK	CHI3L1	NM_002900	ICOSLG	HIVEP1
PRKG1	CA12	PSG1	P4HA2	TBL1X
ITGA4	NCKIPSD	TFF1	E4F1	FNDC8
SYNGR1	PLSCR1	GAGE1	MMP28	SMARCAL1
SMIM14	GSTM2	RASA3	NCAPG2	CHCHD3
VPS52	IGF1R	KDM6B	EPB41L3	ACAN
LIPE	NM_213597	KIFAP3	AIM1L	KIAA1654
CHAD	GNA12	MRE11A	TSEN2	EMP1
PRKCH	SOCS5	ADAM20	SERPINI1	CCL5
PDE3A	LMOD1	ENOX1	ANKHD1	ANKRD28
STAT1	DKFZP434A062	TMOD1	RAB5C	ADM
PLA2G4C	SMTN	BMP2K	KIFC1	CASP1
KMT2B	DEPTOR	UBAC1	SFRP1	QTRTD1
HOXC13	PLCB4	GPLD1	RNF8	NM_002500
RHOB	FRZB	GSTM3	LHX1	MARC2
RHOB	FAM215A	SRSF8	PPIG	MSI1
SYT1	ITGA6	CPS1	CHI3L1	METTL7A
MGLL	PLXNC1	CAV1	ZMYND10	GPR31
P4HA1	ARAP1	ALOX12B	SDHB	PTGER3
CAT	STOM	PPP1CB	PLOD2	LCN2
A2M	ANK1	AHR	RNF114	DNAJC4
NMT2	NOP16	NUP160	NCR2	GALK1
RGS7	ETFB	SLC5A2	C1RL	ENOSF1
ERG	COL14A1	GLRX	TERT	SHANK2
TACC2	CRIP1	MTHFR	NINJ1	GNL3L
PFKP	CLDN8	NR2F2	ERVMER34-1	NMT2
BCL2L1	EML2	CEP57	LAG3	GYPA
	SHC3	KLF10	KIT	OAS2
	ARID5B	CUL4B	NRP1	SOD2
	NGDN	NFKB2	BMP2	CACNG4
	FRMD4B	HIST1H2BH	LGALS3	SLC7A8
	ENOSF1	RBFOX1	PDGFD	OAS1
	GAS1	SMAD3	RTN1	NM_001004691
	CAPN6	GPR153	HERC6	
	NR_002190	ISG20L2		
	PDAP1	KYNU		
	SLC43A3	CEP85		
	CPNE6	AP1S2		
	MCM5	TNIK		
	ACAN	GCDH		
	XCR1	APOC3		
	SFRP1	ARL1		
	MAN1C1	GULP1		
	FAM127B	CUL4B		
	LOC100510519	FNBP1		
	MTUS1	STC1		
	COL21A1	RP2		
	NM_005272	LEPR		
	LIMD1	TTC12		

		NM_206963 CARHSP1 AREG SLC25A1 ITGAV ITGAV SLCO4C1 GSTM1 CTRC BHLHE40 EPHB6	CTSK EFNB3 GSDMD EPHX1 NM_020131 LEPR PTPRO DMPK OPRM1 HYMAI		
--	--	---	---	--	--