

MEMORIA ANUAL CEIm

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio de la familia de proteínas uroplaquinas (UPK) en el ojo humano sano y patológico

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Josep Callizo Tomás

ASUNTO: Projecte UPK_EYE

REFERENCIA CEIm: 082/2017

RESUMEN DEL PROYECTO: Las uroplaquinas (UPK) son una familia de proteínas que siempre han estado muy vinculadas al sistema urinario de mamíferos debido a que forman unas placas que recubren el urotelio de la vejiga, uretra y uréteres. Sin embargo se ha observado que la expresión de estas proteínas no se encuentra restringida al urotelio y tampoco a mamíferos.

De los 6 miembros de la familia de las UPKs que se expresan en humanos, el grupo de investigación sabe que dos de ellos (UPK1b y UPK3c) se expresan en la cornea humana. Sin embargo se desconoce si estos dos miembros se expresan en alguna otra parte del ojo humano, si algún otro miembro de la familia de UPKs se expresa también en alguna parte del ojo y finalmente si la alteración en la expresión de los miembros de la familia de las UPKs que se expresan en alguna parte del ojo pueden estar relacionadas con alguna patología ocular.

De esta manera el grupo de investigación solicitó la recogida de muestras de diferentes partes del ojo por parte del servicio de oftalmología del HUIJXXIII para poder obtener respuestas a las incógnitas arriba planteadas.

OBJETIVOS PLANTEADOS: Los objetivos planteados por el grupo de investigación fueron los siguientes:

- Caracterizar la expresión de las UPKs en el ojo humano a través del análisis de los niveles de expresión transcripcional y proteica además de su localización mediante inmunohistoquímica.
- Estudiar la relación que existe entre la expresión de UPKs y patologías oculares bien a través de sus niveles de expresión transcripcional y proteica además de la identificación de posibles mutaciones.

OBJETIVOS OBTENIDOS: El grupo de investigación ha conseguido recoger hasta la fecha de finalización del plazo propuesto un total de 48 muestras. Del total de muestras la mitad de ellas representan fragmentos de corneas donadoras que fueron implantadas a los pacientes y el resto corresponden a fragmentos de corneas con diferentes patologías.

El hecho de que solo se hayan podido recoger corneas durante este periodo ha impedido que se haya podido analizar la expresión de las UPKs en otras partes del ojo. De esta manera sería necesario poder continuar con el proyecto para poder llevar a cabo un estudio en profundidad de la expresión de las UPKs en las diferentes partes del ojo.

Atendiendo a esta disponibilidad de muestras, por lo tanto, el estudio se ha centrado principalmente en el papel de las UPKs en cornea humana sana y patológica. Por un lado, durante este periodo, además de la recogida de muestras, lo que se ha llevado a cabo ha sido la optimización de los protocolos para llevar a cabo el procesamiento y análisis de las muestras. Para ello se han analizado un número reducido de muestras que han validado los protocolos planteados además de permitir obtener una serie de resultados preliminares.

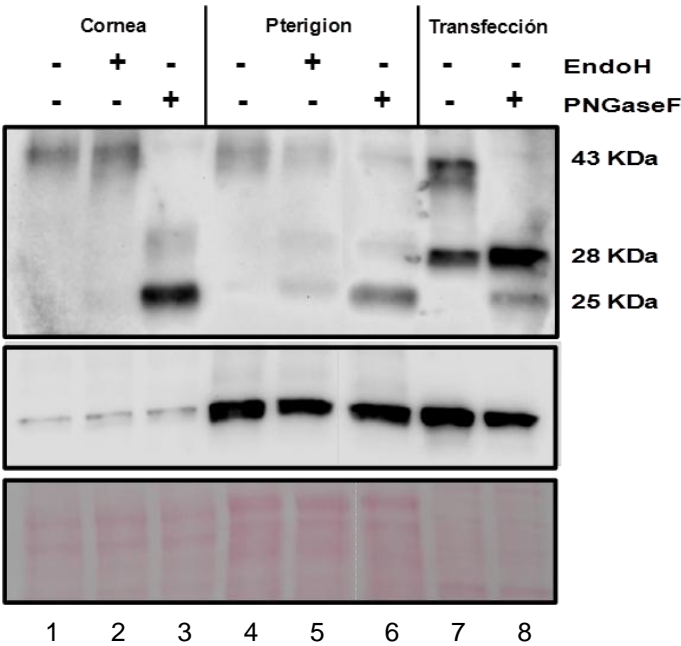
Como resultados preliminares se ha podido detectar la expresión a nivel de proteína de la UPK3c tanto en cornea sana como en pterigión. Además se ha podido comprobar que UPK3c se encuentra glicosilada en cornea sana y que la sensibilidad de esta glicosilación a diferentes glicosidasas podría verse afectada por patologías como sería el caso del pterigión (Anexo). Sin embargo por otro lado aún no se ha podido determinar la expresión de UPK1b debido a que los anticuerpos probados no presentan la sensibilidad necesaria.

Otro de los resultados preliminares obtenidos ha sido en relación al análisis de las copias de UPK3c que se expresan en humanos. En un número reducido de muestras se ha podido observar que mientras que en cornea sana la relación de la expresión de ambas copias se mantiene relativamente constante, en el caso de las muestras de pterigión se ha podido observar que hay muestras que expresan solo una de las dos copias, otras que mantienen la proporción detectada en las muestras de cornea normal y otras que presentan una variación aparentemente significativa frente a las muestras de cornea normal (Anexo). En este caso sería interesante analizar un mayor número de muestras para poder determinar si en aquellos casos en los que se observa la expresión de una sola copia esto es debido a mutaciones o anomalías cromosómicas y si estas tienen algún tipo de repercusión en la patología dado que existen dos copias.

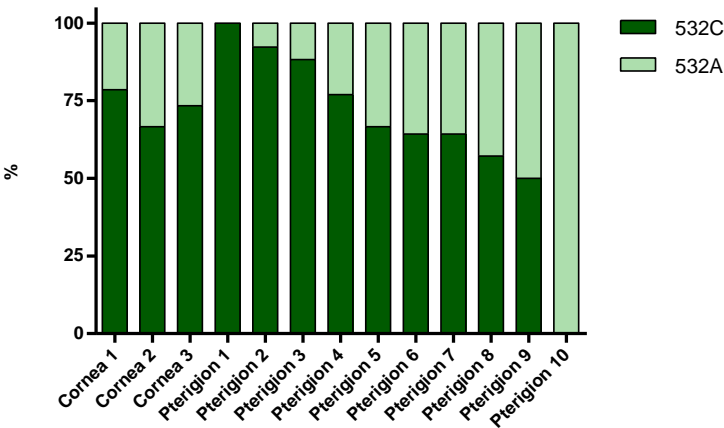
JUSTIFICACIÓN SOLICITUD DE PRORROGA: Aunque durante el periodo que ha sido concedido el proyecto se han conseguido recoger un número elevado de muestras estas solo han sido de corneas normales y patológicas. De esta manera no se ha podido completar uno de los objetivos que se basa en la caracterización de la expresión de las UPKs en las diferentes partes del ojo. Por lo tanto sería necesario que el proyecto fuese prorrogado para poder llevar a cabo esta caracterización y además ampliar la diversidad de patologías oculares.

Con un número reducido de muestras que se han analizado se han obtenido resultados prometedores para poder continuar con la línea de investigación. Por un lado se ha visto que existen diferencias en cuanto a la glicosilación de muestras sanas o patológicas y por otro lado se ha visto una variación en el porcentaje relativo de expresión de ambas copias en pterigión. Estos resultados podrían ayudar a profundizar dentro del estudio de las patologías oculares pero para ello sería necesario ampliar la recolección de las muestras para tener un mayor tamaño muestral y obtener resultados significativos.

ANEXO



Diferentes grados de glicosilación de UPK3c en cornea, pterigion. Extractos proteicos de lisados celulares de cornea, pterigion se trataron con los dos tipos diferentes de N-glicosidasas. La inmunodetección de UPK3c en cornea sana, pterigion muestran diferentes grados de glicosilación y sensibilidad a N-glicosidasas. Una vez deglicosiladas se observan distintos grados de maduración de UPK3c. **(Panel superior)** UPK3c, **(Panel medio)** β -actina y **(Panel inferior)** membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceau S solution como control de carga.



Porcentaje de expresión de las dos copias humanas de UPK3c (UPK3c 532C/A). cDNA de 3 muestras de cornea y 10 de pterigion fueron amplificadas para UPK3c y posteriormente secuenciadas. El porcentaje de expresión fue calculado midiendo la altura relativa de los picos obtenidos para el nucleótido 532. Mientras que en cornea sana la expresión relativa de las dos copias se mantiene entre las muestras, en pterigion se pueden observar variaciones en las expresiones relativas de las dos copias.