



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**Concentración de Acuaporinas
Humanas en Cristalinos con
Catarata Madura**

TESIS

Que para obtener el título de

Médico Oftalmólogo

P R E S E N T A

Orlando Daniel Quintanar Haro

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Ana Beatriz Medina Pérez

Facultad de Medicina



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen

El ojo es un órgano sensorial complejo cuya función consiste en enfocar las imágenes en la retina. El paso de luz a través de este órgano es gracias a la transparencia de sus tejidos avasculares. Por lo que requiere de una regulación precisa del flujo de agua para el mantenimiento de su función. Particularmente, el cristalino requiere una regulación de este flujo para la ejecución del movimiento de acomodación.

Las acuaporinas (AQP) son canales transmembrana que regulan de forma activamente la permeabilidad de membrana al agua en diversos tejidos, incluyendo los oculares. Además la disfunción de estas moléculas ha sido vinculada a edema corneal, catarata congénita y numerosas retinopatías. Sin embargo, se desconoce su papel en la fisiopatología de la catarata senil.

El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de proteína total, AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en muestras de catarata madura y correlacionarlo con variables clínicas como la edad, género, enfermedades sistémicas, lateralidad de la catarata, dureza, y las enfermedades oftalmológicas de los pacientes reclutados

Se obtuvieron 35 muestras correspondientes a 18 hombres y 17 mujeres con edad promedio de 72 años. Los resultados de este estudio muestran que la concentración de proteína total y de las cuatro acuaporinas estudiadas no tiene relación con las características clínicas de los pacientes y que, en general, la concentración de acuaporinas fue muy cercana a cero. Aunque se encontraron tendencias interesantes con respecto al papel de acuaporina 5 en la diabetes mellitus y la dureza de la catarata.

La baja concentración de acuaporinas podría interpretarse como un marcador indirecto del metabolismo de las fibras cristalinas, y de su capacidad de compensar el estrés oxidativo generado por la toxicidad de la luz y mediante el movimiento de agua, la eliminación de radicales libres, piruvato y otros elementos hidrosolubles de pequeño tamaño molecular hacia el humor acuoso, apoyando la idea de que la disminución de la permeabilidad al agua es parte importante de la fisiopatología de la catarata senil.

Tabla de contenido

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
ACUAPORINAS	5
ACUAPORINAS EN EL CRISTALINO	5
ACUAPORINAS Y CATARATA	7
JUSTIFICACIÓN	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
ÉTICA Y RECURSOS FINANCIEROS	10
RESULTADOS	13
LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA CRISTALINIANA NO TIENE RELACIÓN CON LA EDAD	19
LA CONCENTRACIÓN DE AQP0, AQP1, AQP5 Y AQP7 NO TIENE RELACIÓN CON LA EDAD	20
LA CONCENTRACIÓN DE AQP0, AQP1, AQP5 Y AQP7 NO DIFIERE CON RESPECTO AL GÉNERO	21
LA CONCENTRACIÓN DE AQP0, AQP1, AQP5 Y AQP7 NO DIFIERE CON RESPECTO A LA COMORBILIDAD SISTÉMICA	22
LA CONCENTRACIÓN DE AQP0, AQP1, AQP5 Y AQP7 NO DIFIERE CON RESPECTO A LA LATERALIDAD DE LA CATARATA	23
LA CONCENTRACIÓN DE AQP0, AQP1, AQP5 Y AQP7 NO DIFIERE CON RESPECTO A LA DUREZA DE LA CATARATA	24
LA CONCENTRACIÓN DE ACUAPORINAS NO DIFIERE CON RESPECTO A LA COMORBILIDAD OFTALMOLÓGICA	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	31

Introducción

El ojo es un órgano sensorial complejo que recopila la información visual para que sea interpretada por la corteza cerebral y tiene un papel preponderante en el ciclo circadiano. Sus elementos ópticos principales, la córnea y el cristalino, son tejidos avasculares que requieren una regulación precisa del flujo de agua y iones para el mantenimiento de su transparencia con el fin de enfocar la luz de forma precisa en la retina.

Como se puede apreciar en la Figura 1, el cristalino es un órgano transparente y avascular que se encuentra intrínseco al ojo, posterior al iris y anterior a la cavidad vítrea, rodeado por el cuerpo ciliar, al que se une por medio de la zónula. El cristalino tiene como función mantener su propia transparencia y el adecuado enfoque de la luz en la retina en proporción a la distancia del objeto de fijación, por lo que tiene un poder óptico base que se enfoca en el punto remoto y un poder óptico dinámico que se enfoca en el punto próximo gracias a la acomodación (1).

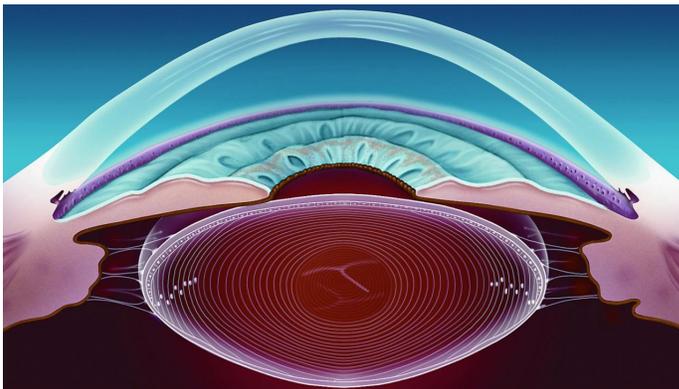
La acomodación es un reflejo sinquinético que involucra tres fenómenos que actúan de forma simultánea: miosis, convergencia y acomodación. La miosis como la contracción del esfínter pupilar que reduce el diámetro pupilar, convergencia como la contracción de ambos rectos mediales y la acomodación como la contracción del músculo ciliar. A este último se opone la resistencia dada por las fibras ecuatoriales zonulares (2). El fenómeno de acomodación se ve afectado por la edad de manera multifactorial reduciendo la amplitud y fuerza de contracción del músculo ciliar así como la capacidad de deformación del cristalino. Consecuentemente, a medida que el individuo envejece el cristalino adquiere mayor poder óptico y menor capacidad de acomodación (1).

Histológicamente, el cristalino contiene dos tipos celulares: Las células epiteliales, Una monocapa de células epiteliales en la zona anterior del cristalino, y las fibras cristalinas, que son células diferenciadas que se elongan y están desprovistas de organelos membranosos. Estos últimos componen la mayoría del volumen cristaliniano (3). Las fibras cristalinas contienen altas concentraciones de cristalin, proteínas hidrosolubles que se encuentran asociadas dentro el citosol por uniones no covalentes, disminuyendo así su índice de refracción, manteniendo la transparencia y reduciendo la dispersión de la luz (1).

No obstante, el cristalino como un órgano dinámico, requiere de un control adecuado del flujo de agua. Por lo que la habilidad del epitelio y las fibras cristalinas para mover agua a través de la membrana plasmática es un proceso fundamental que permite la secreción de fluido, la entrega de nutrientes y la remoción de material de desecho, además de la regulación de volumen celular y consecuentemente, la transparencia del órgano (3, 4).

Figura 1

El Cristalino



El cristalino es estructura ocular que se encarga del adecuado enfoque de la imagen en relación a la distancia con objeto de fijación. Se ubica en la cámara posterior del ojo, suspendido por la zónula; estructura que a su vez es sostenida por sus uniones con el cuerpo ciliar y la base vítrea

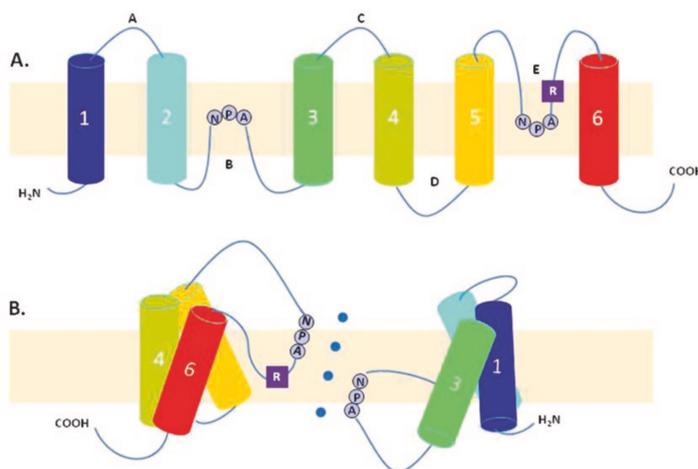
Acuaporinas

Las acuaporinas (AQP) son una familia canales transmembrana que regulan el flujo de agua intercelular e intracelular (5-8). Hasta el momento, trece AQPs se han caracterizado en humanos y su expresión es específica para el tipo celular. El descubrimiento y caracterización de AQP1 le valió el premio Nobel en Química al Dr. Peter Agre en 2003 (3, 9, 10).

Como puede apreciarse en la Figura 1, cada monómero de AQP consiste en 6 hélices alfa transmembrana que forman un poro transportador de agua. La unidad funcional de AQP consiste en su agrupación en tetrámeros con dos motivos Asparagina-Prolina-Alanina (NPA) embebidos en la membrana celular. Estas proteínas hidrofóbicas facilitan en transporte pasivo de agua en relación a la presión osmótica entre el interior y el exterior de la membrana celular (8). Adicionalmente, se ha demostrado de las acuaporinas son capaces de transportar otras pequeñas moléculas sin carga (8).

Figura 2

Estructura Molecular de las AQP, adaptado de Li y Wang (7)



Topología de la estructura secundaria de AQP. **(A)** Un monómero de AQP1 tiene seis regiones transmembrana (1-6), 5 asas (A-E) con términos carboxílicos y amino intracelulares así como repeticiones en tándem. **(B)** En el monómero, las asas hidrofílicas B y E se pliegan hacia la cavidad y se encuentran en el medio para formar un canal selectivo que consiste en dos motivos de consenso NPA (Asn-Pro-Ala). La región Ar/R se muestra cerca de la entrada al poro.

La familia de AQPs se divide en tres subfamilias: Acuaporinas clásicas (AQP0, 1, 2, 4 y 5), Gliceroacuaporinas (AQP3, 7, 9 y 10) y acuaporinas no ortodoxas (AQP6, 8, 11, y 12) (7, 11). Todas las acuaporinas son permeables a agua, sin embargo, las gliceroacuaporinas también son permeables al glicerol y otras moléculas pequeñas. Las acuaporinas no ortodoxas se caracterizan porque no tienen la característica secuencia de caja NPA y porque AQP11 y AQP12 tienen una localización intracelular (3).

Acuaporinas en el Cristalino

Se ha descrito que AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 se expresan en el tejido cristalino, sin embargo su concentración dentro de este tejido y sus contribuciones a la fisiología cristalina aún se desconocen (3). Se ha establecido en modelos mamíferos que su expresión es dinámica y que tiene relación con los estadios de diferenciación de epitelio a fibra cristalina. Las células epiteliales contienen principalmente AQP1 (12) y también se ha demostrado la presencia que AQP5 y AQP7 (3, 13-15). Por otro lado, las fibras cristalinas contienen principalmente AQP0. Adicionalmente, AQP5 también se ha encontrado en las fibras, aunque en una concentración mucho menor,

calculada como el 5% de AQP0 (3, 14-17). La Tabla 1 ilustra la clasificación y transporte de estas cuatro acuaporinas. La Figura 3 ilustra la presencia de las cuatro acuaporinas en el cristalino.

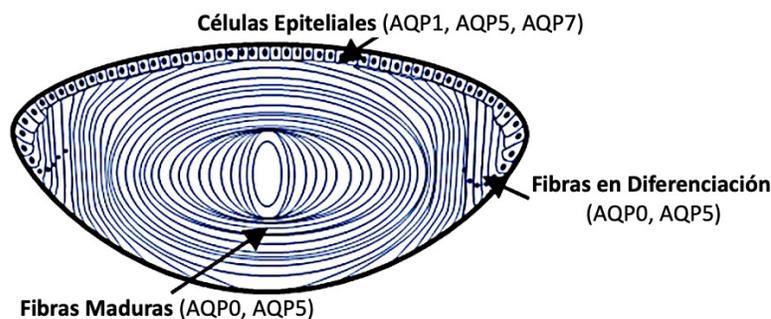
Tabla 1

Subfamilia, Transporte Molecular y Distribución Tisular de las Acuaporinas Presentes en el Cristalino. Adaptado de Li y Wang (8) y Schey, et al.(3)

Acuaporina	Subfamilia	Transporte	Distribución Tisular
AQP0	Acuaporina	Agua	Ojo Cerebro, ojo, riñón, corazón, tracto gastrointestinal, glándula salival, hígado, ovario, testículo,
AQP1	Acuaporina	Agua	músculo, eritrocito, bazo Glándula salival, pulmón, tracto gastrointestinal, ovario, ojo, riñón
AQP5	Acuaporina	Agua, CO ₂	Testículo, corazón, riñón, ovario, grasa, ojo
AQP7	Gliceroacuaporina	Agua, urea, glicerol, armonio	

Figura 3

Expresión de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en el Cristalino. Adaptado de Schey (3)



AQP0 es la más abundante en el cristalino, se encuentra sobre todo en el núcleo y las fibras cristalinas. AQP1 se expresa mayormente en el epitelio cristalino y las fibras circundantes. AQP5 se encuentra principalmente en las fibras cristalinas. AQP7 se expresa mayormente en el epitelio

AQP0 se expresa principalmente en las fibras cristalinas, tiene una baja permeabilidad comparado con AQP1, la cual se estima que de 20 a 40 veces menor (3, 8). El movimiento de agua a través de AQP0 es regulada por la escisión de su terminal carboxílica, pH y calcio/calmodulina. La disminución de la concentración de calcio intracelular o la inhibición de calmodulina resulta en un aumento en la permeabilidad de este transportador. Adicionalmente, la fosforilación en su residuo Ser235 parece causar su traslocación a la membrana celular (8). En cristalininos de rata, estudios de inmunofluorescencia indican que la localización de AQP0 cambia con respecto a la distancia a la que se encuentra la fibra de la cápsula (18). En la corteza externa, AQP0 está distribuida en las aristas de los hexágonos que forman las fibras. Más profundamente en la corteza, AQP0 forma predominantemente estructuras en forma de placas en los lados anchos de las fibras, que son consistentes con las formas de lengua-ranura y moño que se han encontrado en fragmentos de cristalininos congelados (19, 20). En la corteza interna, AQP0 es nuevamente redistribuida a través de la membrana plasmática (18). Dentro del núcleo cristalino, AQP0 está presente en uniones pequeñas de 11 a 13 nm, dando fundamento a su rol como proteína estructural del cristalino (21). Estos cambios en la localización de AQP0 pueden ser críticos para la modulación de la función proteica en cristalininos maduros, de un poro permeable al agua a una proteína de unión (3)

AQP1 se ha encontrado expresada en diversos tejidos donde tiene un papel preponderante en la regulación del transporte de agua. AQP1 también tiene un rol importante en angiogénesis, migración y crecimiento celular. La disminución en la expresión de AQP1 se ha relacionado con inhibición de angiogénesis y crecimiento tumoral. Además de facilitar el movimiento de agua, se ha revelado que AQP1 podría aumentar la permeabilidad a CO₂ y NH₃, y que funciona como un canal no selectivo para cationes monovalentes cuando se activa por cGMP. La fosforilación de su residuo Y253 regula su permeabilidad (8). AQP1 se encuentra en la membrana apical y basolateral de las membranas de células epiteliales (22). Durante la migración hacia el ecuador, y durante su diferenciación, la abundancia relativa de AQP1 disminuye y es gradualmente sustituida por AQP0.

AQP5 se expresa en epitelio glandular, alveolar y glándulas secretoras. Está relacionado con la generación de saliva, lágrima y secreciones pulmonares. AQP5 es permeable a agua y CO₂, y puede ser fosforilada en sus residuos Ser156 y Thr259. El incremento del calcio intracelular aumenta su permeabilidad (8). Estudios transcriptómicos, proteómicos y de inmunofluorescencia sugieren que AQP5 se encuentra en mucha menor abundancia que AQP0 en el cristalino (14-16); y que se trasloca del citosol a la membrana celular durante la diferenciación de las fibras cristalinas (15). Actualmente, el rol de la translocación de AQP5 hacia la membrana celular no está bien comprendida, aunque se ha propuesto que asiste al transporte de agua en el núcleo (15).

AQP7 facilita el transporte de agua, glicerol, urea, amoníaco y NH₃. AQP7 se expresa abundantemente en tejido adiposo. La regulación anormal del flujo de glicerol es un factor importante para la génesis de enfermedad metabólica. Es por ello plausible que la deficiencia de AQP7 cause obesidad y resistencia a la insulina. Se ha descrito que la lipólisis incrementa la traslocación de AQP7 a la membrana celular. La regulación de su permeabilidad es aún un misterio (8).

Acuaporinas y Catarata

Aunque numerosas mutaciones del tipo autosómico dominante en AQP0 causan catarata, mutaciones en otras AQPs no se han asociado a fenotipos cristalinos en humanos. La delección de AQP1 en ratones causa el desarrollo acelerado de catarata en condiciones de estrés (22), aunque humanos con mutaciones naturales de AQP1 no muestran signos de catarata (23). Adicionalmente, no se ha demostrado el desarrollo de catarata en ratones con delecciones en AQP5. (3, 14, 24)

La importancia crítica de AQP0 en el cristalino es destacada por el hecho de que mutaciones en AQP0 dan lugar a cataratas congénitas. Se ha descrito que varias de estas mutaciones causan un tráfico inapropiado de AQP0, su secuestro en el retículo endoplásmico, alteración de sus interacciones proteicas y de su permeabilidad, como es el caso de la delección de la base 213 en humanos (25). Familias con mutación G165D también se caracterizan por tráfico alterado de AQP0 (26). Otra mutación, R233K, no afecta la localización de AQP0, pero reduce su capacidad de unión a calmodulina (27). Muchas otras mutaciones familiares en AQP0 han sido reportadas, todas ellas causan catarata congénita. (3, 28-34)

Justificación

El entendimiento del papel que tienen las acuaporinas en el mantenimiento de la transparencia y otras funciones fisiológicas cristaliniánas es de suma relevancia para poder continuar con el entendimiento de sus funciones en la vida humana.

Se ha establecido contundentemente que las acuaporinas tienen un papel preponderante en la génesis de los diferentes tipos de catarata. Debido a ello, dichas proteínas se perfilan como marcadores biológicos que pueden servir para diferentes objetivos. Por un lado, la caracterización de los patrones de expresión de dichas proteínas podría ayudar a conocer los mecanismos que dan lugar a la catarata. Por otro lado, las acuaporinas pueden servir como objetivos terapéuticos en el futuro próximo. La manipulación de la expresión genética de diferentes tipos de acuaporinas podría servir para retrasar el ritmo con el que el cristalino pierde su transparencia en condiciones fisiológicas, podría detener este proceso o incluso revertirlo, por lo que las acuaporinas se perfilan como los instrumentos de futuras terapias para el tratamiento de la catarata con la ventaja potencial de mantener la acomodación.

Además de ello, no se ha establecido si el incremento o decremento en la concentración de proteínas cristaliniánas puede ser secundario al mecanismo fisiopatológico de cada una de ellas.

La clarificación de estos hechos nos será de gran ayuda para comenzar por describir los mecanismos fisiopatológicos de los diferentes tipos de catarata en términos de cambios en la concentración, expresión genética, localización y función proteica, y cómo es que estos cambios pueden traducirse en la predicción de fenómenos clínicos e incluso quirúrgicos que ayuden a la mejor intervención de dichas patologías para finalmente ser el precedente de una línea de investigación con respecto al tratamiento de la catarata.

Pese a que se sabe que la incidencia de catarata aumenta con la edad, se desconoce si el envejecimiento tiene un efecto deletéreo en la concentración de proteínas del cristalino, si esto tiene algún efecto en la concentración de acuaporinas y secundariamente en la permeabilidad de este tejido al agua.

Planteamiento del Problema

Pregunta de Investigación: ¿Cuáles son las diferencias en la concentración de proteína total y acuaporinas 0, 1, 5 y 7 en pacientes con catarata madura relativo a su edad y otras variables clínicas?

Objetivo General: Caracterizar las concentraciones de acuaporina 0, 1, 5 y 7 en cristalinos con catarata madura con respecto a sus características clínicas

Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar la relación de la edad con la concentración de proteína total en catarata madura
- 2) Establecer la relación de la edad con la concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en catarata madura
- 3) Determinar la relación del género con la concentración de proteína total en catarata madura
- 4) Describir la relación del género en la concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en catarata madura
- 5) Correlacionar las comorbilidades sistémicas con la concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en catarata madura
- 6) Relacionar la lateralidad de la catarata con la concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en catarata madura
- 7) Asociar la opalescencia prequirúrgica de la catarata con la concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en catarata madura
- 8) Determinar la relación del color prequirúrgico de la catarata con la concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en catarata madura
- 9) Describir la relación de las comorbilidades oftalmológicas con la concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 en catarata madura

Hipótesis Nula (H_0): Las concentración de proteína total y de acuaporinas 0, 1, 5 y 7 no difieren a pesar del género, edad, lateralidad o comorbilidad del paciente

Hipótesis Alternativa (H_0): Las concentraciones de acuaporinas 0, 1, 5 y 7 difieren respecto al género, edad, lateralidad o comorbilidad del paciente

Cálculo y Selección de la Muestra

El cálculo de muestra se basó en la ecuación de Cohen usando el programa G Power de la Universidad de Düsseldorf. Dicha ecuación es ideal para a comparación dos grupos con desviación estándar similar. Para ello se consideró un efecto de 0.7, error alfa de 5% y poder de 95% . De esta manera se obtuvo una n mínima de 16.

Criterios de Selección

La Tabla 2 describe los criterios de selección para el reclutamiento de muestras biológicas

Tabla 2

Criterios de Inclusión, Exclusión y Eliminación

Inclusión	Exclusión	Eliminación
Género indistinto	Cirugía intraocular previa	Muestra inadecuadamente procesada
Edad mayor a 50 años	Enfermedad inflamatoria intraocular previa	Expediente incompleto
Catarata madura Extracción extracapsular de catarata		

Ética y Recursos financieros

El proyecto fue propuesto, evaluado y aprobado por el comité de ética de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I. A. P. con base en los preceptos de la Declaración de Helsinki y mediante un consentimiento informado. Los recursos financieros fueron otorgados por la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I. A. P., con autorización del Dr. Jaime Lozano Alcázar, director médico, el Mtro. Pablo Cruz Yañez, director general.

Métodos

Se realizó un estudio observacional, analítico, comparativo, y retrospectivo. Se reclutaron pacientes sometidos a cirugía de catarata por extracción extra capsular desde Mayo de 2019, hasta Noviembre de 2020. Los datos obtenidos de los expedientes y sus muestras biológicas fueron recolectados y plasmados en una base de datos para su posterior reporte y análisis.

Obtención y Almacenamiento de las Muestras

Las muestras cristalinianas fueron obtenidas mediante cirugía extracapsular de catarata tras realizar la maniobra de presión-contrapresión y almacenadas en BSS. Tras haber terminado la sutura de la conjuntiva, la muestra fue bi- o tri-seccionada mediante una hoja de bisturí para su almacenamiento en buffer inhibidor de proteasas, formol al 10% o solución salina, de acuerdo a la metodología de los protocolos participantes en el estudio de núcleos obtenidos mediante extracción extracapsular.

Tras haber colocado las muestras biológicas en viales de 1.5 mL (Eppendorff[®]), estos fueron adecuadamente marcados con el número de expediente y fecha de nacimiento de cada paciente para su posterior identificación. Cada muestra biológica fue inmediatamente resguardada a 4°C por uno a tres días y posteriormente se resguardaron a -80 °C indefinidamente hasta la realización de los experimentos.

Medición de Peso Húmedo

Tras haber sido almacenadas a -80 °C, las muestras fueron expuestas a temperatura ambiente por aproximadamente 40 minutos hasta haber confirmado visualmente la fusión del buffer inhibidor de proteasas.

Para disminuir la variabilidad durante la medición del peso húmedo cristaliniano, se substituyó el buffer inhibidor de proteasa de cada muestra con 1 mL de *buffer* de fosfato salino (PBS) y posteriormente se pesó cada muestra en una microbalanza (XPR, Mettler Toledo[®]) previamente calibrada con un tubo idéntico con 1 mL de PBS.

Trituración de las Muestras

Cada muestra biológica con su correspondiente volumen de PBS fue vertida en un mortero y triturada manualmente hasta confirmar visualmente una mezcla homogénea. Posteriormente, cada emulsión fue tomada con pipeta y devuelta a su correspondiente tubo.

Aislamiento de Proteínas

Cada muestra fue centrifugada a 7,200 revoluciones por minuto por 5 minutos. Posteriormente se almacenaron por separado el sobrenadante y *pellet* de cada muestra.

Cuantificación de Proteínas

El sobrenadante de cada muestra fue homogeneizada mediante vibración gentil. Posteriormente se tomaron 2 microlitros de cada una para su cuantificación mediante espectrofotometría a 280 nm utilizando el equipo Nanodrop (Thermo Scientific[®]).

Ensayos de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)

Cada muestra fue diluída 1:1 con PBS y posteriormente se utilizaron kits de ELISA para la cuantificación de acuaporina 0 (MBS042701, MyBioSource[®]), acuaporina 1 (OKEH02648, Aviva Systems Biology[®]), acuaporina 5 (OKEH02652, Aviva Systems Biology[®]) y acuaporina 7 (MBS7253806, MyBioSource[®]). Cada medición fue realizada de acuerdo con las especificaciones de su fabricante, por duplicado.

A diferencia de los kits para acuaporina 0, 1 y 5, el kit de acuaporina 7 fue diseñado para para cuantificar la proteína de forma competitiva usando un conjugado de peroxidasa con acuaporina 7 en lugar de un segundo anticuerpo. Debido a que el número de sitios de unión de acuaporina 7 es limitado, mientras más sitios son ocupados por el antígeno, menor es la proporción del conjugado que puede unirse, por lo que la intensidad del color (y la medición por espectrofotometría) es inversamente proporcional a la concentración de acuaporina 7.

Se obtuvo la medición espectrofotométrica utilizando el equipo BIOTEK con software Gen 5.1. Una vez obtenida la medición espectrofotométrica, se tomó la media de los duplicados para realizar la curva de concentración de los estándares y posteriormente una regresión lineal para el cálculo de la concentración de cada AQP se tomó como adecuado un coeficiente de correlación mayor a 0.90 para la curva estándar de la concentración. Debido a que racionalmente no pueden existir concentraciones negativas de una proteína, todos los valores del cálculo que arrojaran un valor negativo fueron igualados a cero.

Análisis e Interpretación de Datos

La estadística descriptiva e inferencial se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism versión 8.2.1 (GraphPad Software Inc.). Para confirmar la normalidad de cada distribución se realizaron los tests de D'Angostino-Pearson y Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó la prueba de Pearson para correlación de muestras normales, en el caso contrario se utilizó la prueba de Rhode Spearman y se consideró como relación causal o de asociación un coeficiente de correlación mayor a 0.70. Se utilizó el test de Student para los grupos con distribución normal, en caso contrario se utilizó el test de Mann Whitney. Todas las pruebas fueron de dos lados y los valores de p menores a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

Identificación y Descripción de Variables

La Tabla 3 ilustra las variables consideradas en este protocolo de investigación

Tabla 3
Variables a Analizar

	Unidad	Nivel de Escala
Edad	Años	De Razón
Género	Masculino/Femenino	Nominal
Comorbilidad	Enfermedad	Nominal
Concentración de Proteína	Miligramos por Mililitro o Picogramos por Mililitro	De Razón

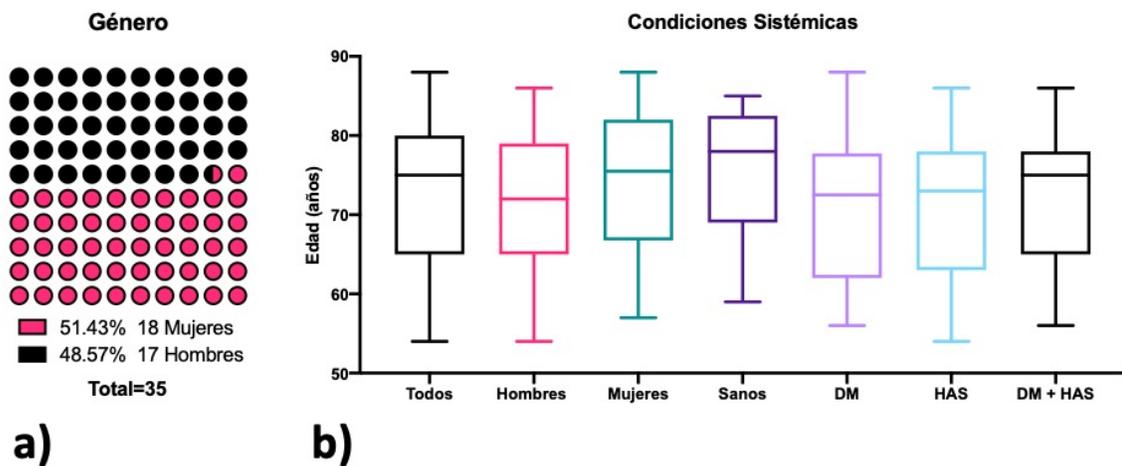
Resultados

Tras el escrutinio de los criterios de inclusión, exclusión y eliminación, se lograron reclutar 35 pacientes con sus respectivas muestras cristalínicas. Como puede apreciarse en la Figura 4-a, las muestras biológicas pertenecen a 18 mujeres y 17 hombres. La edad del universo estudiado fue de 54 a 88 años de edad, con un promedio de 72 años, como se detalla en la Tabla 4. Se consideró como mínimo 5 muestras biológicas por grupo para la subdivisión de los pacientes por condición sistémica, como se puede observar en la Figura 4-b y en la Tabla 4.

Con respecto a sus comorbilidades sistémicas, 14 pacientes eran sanos, y los otros 21 tenían antecedente de al menos una enfermedad sistémica. Entre los pacientes con antecedentes sistémicos positivos, 8 pacientes tenían diagnóstico de una sola enfermedad, mientras que 13 tenían diagnosticadas dos o más enfermedades sistémicas. De ellos, 16 pacientes tenían diabetes mellitus (DM), 15 pacientes hipertensión arterial sistémica (HAS) y 11 pacientes tenían diabetes mellitus e hipertensión arterial sistémica (DM + HAS). Todos estos grupos tuvieron una distribución normal de acuerdo a las pruebas estadísticas, como se puede apreciar en la Tabla 4.

Figura 4

Distribución de Género y Edad de acuerdo a Condiciones Sistémicas



a) Proporción del universo de acuerdo al género. **b)** Distribución del universo de acuerdo a la edad variables variables sistémicas.

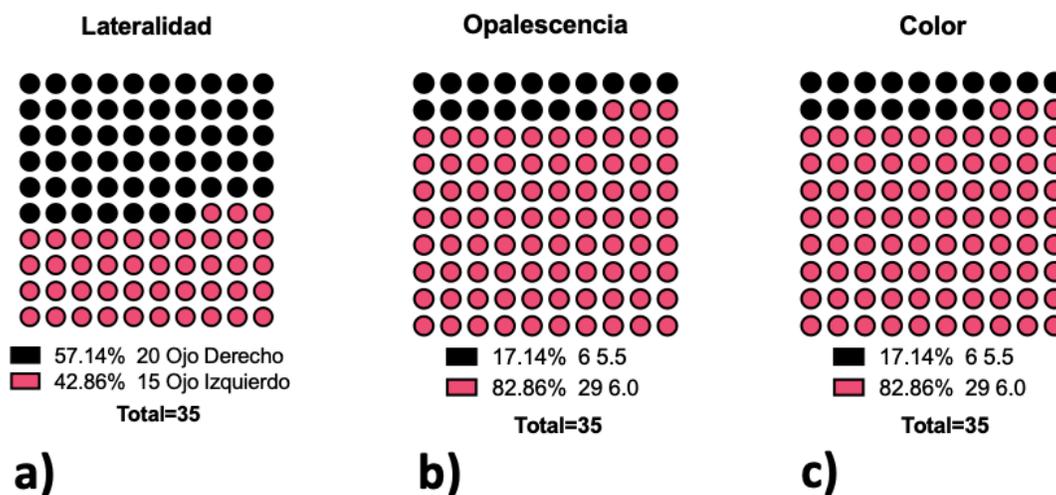
Tabla 4*Estadística Descriptiva de la Edad y su División por Condiciones Sistémicas*

	Todos	Hombres	Mujeres	Sanos	DM	HAS	DM + HAS
Número	35	17	18	14	16	15	11
Mínimo	54	54	57	59	56	54	56
Máximo	88	86	88	85	88	86	86
Rango	34	32	31	26	32	32	30
Promedio	72.9	71.8	73.9	75.9	71.3	71.1	72.6
DE	9.7	10.0	9.6	8.2	10.3	10.1	9.9
CV	0.13	0.14	0.13	0.11	0.14	0.14	0.14
Distribución*	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Nota: DM = Diabetes Mellitus, HAS = Hipertensión Arterial Sistémica, DE = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

* Se realizaron pruebas de normalidad mediante las pruebas de D'Angostino & Pearson y Kolmogorov-Smirnov

Como se puede apreciar en la Figura 5 y la Tabla 5, se obtuvieron 20 núcleos de ojo derecho y 15 de ojo izquierdo. Con respecto a la clasificación clínica LOCS 3, la opalescencia y color de dichas muestras fue clasificada como 5.5 en 6 pacientes y las otras 30 muestras como 6.0. Estos grupos tuvieron una distribución normal con respecto a la edad.

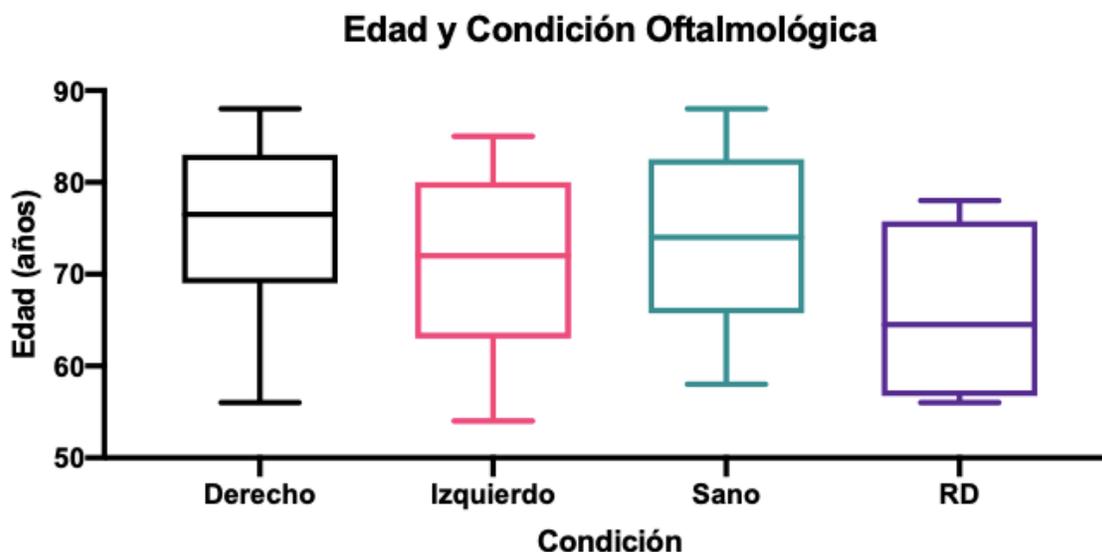
Figura 5*Lateralidad, Opalescencia y Color de las Muestras Cristalinas*

a) Lateralidad de la muestra obtenida, **b)** Opalescencia del cristalino obtenido, medida clínicamente previo a la cirugía, basado en la clasificación LOCS 3, **c)** Color del cristalino obtenido, medido clínicamente previo a la cirugía, basado en la clasificación LOCS 3

Adicionalmente 18 pacientes se reportaron sanos, y otros 6 tenían diagnóstico de retinopatía diabética (RD), como se puede apreciar en la Figura 6 y en la Tabla 5. Estos grupos tuvieron una distribución normal con respecto a su edad.

Figura 6

Distribución de la Edad por Subgrupo de Acuerdo a las Condiciones Oftalmológicas



Distribución de la edad de los pacientes con respecto a lateralidad y estado oftalmológico

Tabla 5

Estadística Descriptiva de la edad y su Estratificación por Variables Oftalmológicas

	Derecho	Izquierdo	Sano	RD
Número	20	15	18	6
Mínimo	56	54	58	56
Máximo	88	85	88	78
Rango	32	31	30	22
Promedio	75	71	74	66
DE	9.6	9.7	9.4	9.3
CV	13%	14%	13%	14%
Distribución*	Normal	Normal	Normal	Normal

Nota: RD = Retinopatía Diabética, DE = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

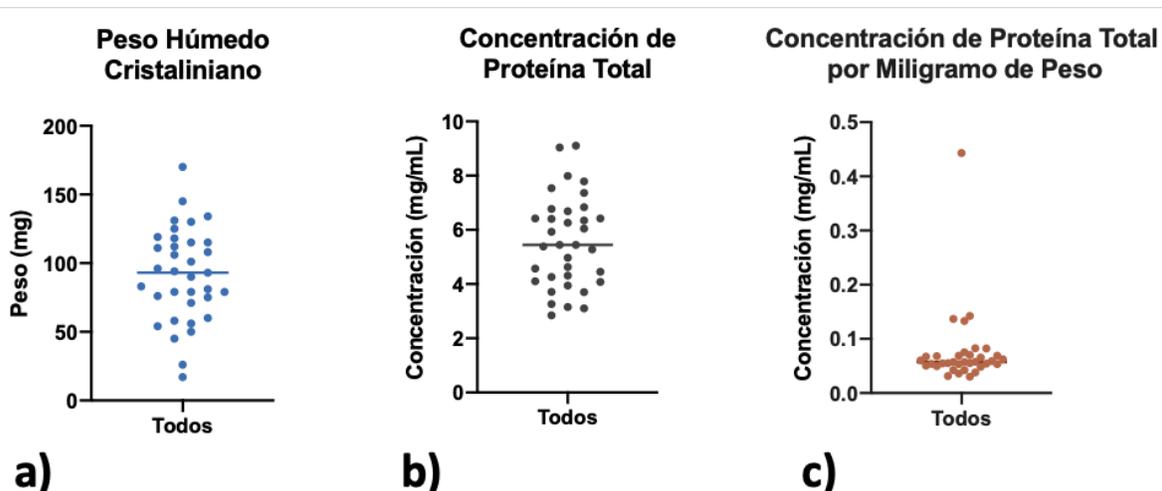
* Se realizaron pruebas de normalidad mediante las pruebas de D'Angostino & Pearson y Kolmogorov-Smirnov

El peso húmedo de las muestras biológicas tuvo un promedio de 91.5 mg, mientras que la concentración de proteína total tuvo un promedio de 5.53 mg/ml. Al normalizar la concentración

de proteína total con el peso húmedo obtenido se encontró una concentración promedio de 0.075 mg/ml de proteína por miligramo de peso cristaliniano, como puede apreciarse en la Figura 7 y la Tabla 6. El peso húmedo y la concentración de proteína total tuvieron una distribución normal, sin embargo, esta distribución no se conservó en el análisis de concentración de proteína total por miligramo de peso.

Figura 7

Peso Húmedo, Concentración de Proteína Total y Concentración de Proteína Total por Miligramo de Peso de las Muestras Cristalinianas



a) Peso húmedo de las muestras biológicas, b) Concentración de proteína total, c) Normalización de concentración de proteína total con el peso húmedo obtenido de las muestras cristalinianas

Tabla 6

Estadística Descriptiva del Peso y la Concentración de Proteína Total Cristaliniana

	Peso Húmedo (mg)	Concentración de Proteína Total*	Concentración de Proteína total por Miligramo de Peso*
Número	35	35	35
Mínimo	17	2.85	0.030
Máximo	170	9.11	0.443
Rango	153	6.26	0.413
Promedio	91.5	5.53	0.075
DE	33.9	1.68	0.069
CV	37.1%	30.3%	92.9%
Distribución**	Normal	Normal	No normal

Nota: DE = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

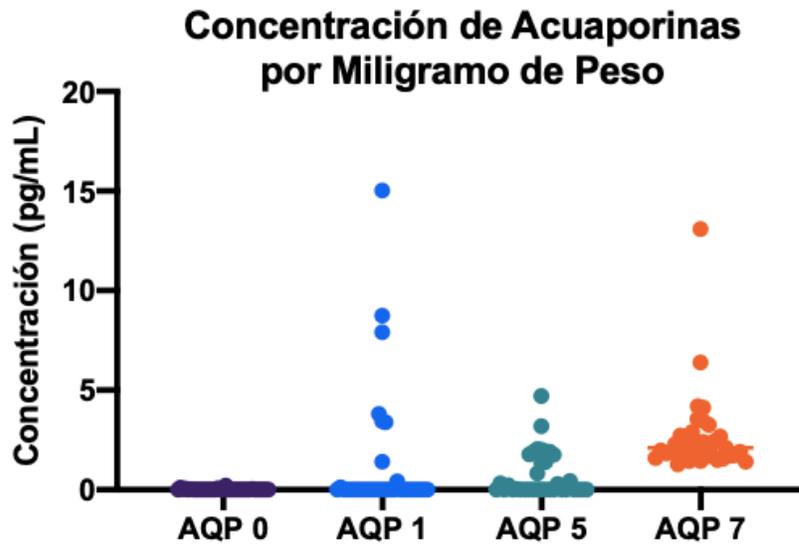
* Concentración expresada en miligramos por mililitro (mg/mL)

** Se realizaron pruebas de normalidad mediante las pruebas de D'Angostino & Pearson y Kolmogorov-Smirnov

Como puede apreciarse en la Figura 8 y la Tabla 7, la concentración de AQP0 tuvo un promedio de 1.6 pg/mL, la de AQP1 de 109.5 pg/mL, la de AQP5 de 56.3 pg/mL y la de AQP7 de 194 pg/mL. Ninguno de los grupos tuvo distribución normal.

Figura 8

Concentración de Acuaporina 0, 1, 5 y 7 en las Muestras Cristalinas por Miligramo de Peso



Concentración de acuaporinas por miligramo de peso húmedo cristaliniiano

Tabla 7

Estadística Descriptiva de la Concentración de Acuaporinas por Miligramo de Peso

	Acuaporina 0*	Acuaporina 1*	Acuaporina 5*	Acuaporina 7*
Número	35	35	35	35
Mínimo	0	0	0	1.27
Máximo	0.20	15.02	4.71	13.10
Rango	0.2043	15.02	4.71	13.10
Percentil 25%	0	0	0	1.27
Mediana	0	0	0	2.1
Percentil 75%	0.01	0.13	1.76	2.73
CV	244.9%	253.1%	151.0%	78.63%
Distribución**	No Normal	No Normal	No Normal	No Normal

Nota: DE = Desviación Estándar, CV = Coeficiente de Variación

* Concentración expresada en picogramos por mililitro (pg/mL)

** Se realizaron pruebas de normalidad mediante las pruebas de D'Angostino & Pearson y Kolmogorov-Smirnov

Se realizó una prueba de t no pareada para comparar la edad con respecto a las condiciones sistémicas como puede apreciarse en la Tabla 8. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la edad de los pacientes en relación con sus condiciones sistémicas.

Tabla 8

Estadística Inferencial de la Edad con Respecto a las Condiciones Sistémicas de los Pacientes

Grupos Comparados	Prueba Utilizada	Valor de p	Interpretación Estadística
Hombres y Mujeres	t de Student	0.52	No diferentes
Sanos y DM	t de Student	0.18	No diferentes
Sanos y HAS	t de Student	0.17	No diferentes
Sanos y DM + HAS	t de Student	0.38	No diferentes
DM y HAS	t de Student	0.97	No diferentes
DM y DM + HAS	t de Student	0.72	No diferentes
HAS y DM + HAS	t de Student	0.70	No diferentes

Nota: DM = diabetes mellitus, HAS = hipertensión arterial sistémica, DM + HAS = diabéticos e hipertensos

Como puede apreciarse en la Tabla 9, también se realizó la prueba de t no pareada para comparar la edad con respecto a la lateralidad y la comorbilidad oftalmológica. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad con respecto a la lateralidad de la muestra obtenida, así como entre pacientes sanos y aquellos con retinopatía diabética.

Tabla 9

Estadística Inferencial de la Edad con Respecto a las Condiciones Oftalmológicas de los Pacientes

Grupos Comparados	Prueba Utilizada	Valor de p	Interpretación Estadística
OD y OI	t de Student	0.25	No diferentes
Sanos y RD	t de Student	0.07	No diferentes

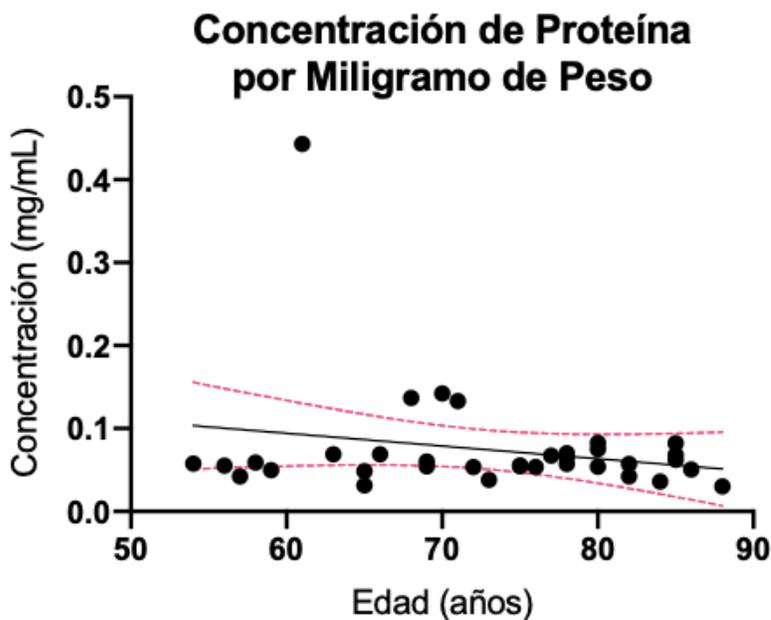
Nota: OD = ojo derecho, OI = ojo izquierdo, RD = retinopatía diabética

La Concentración de Proteína Cristaliniana no tiene Relación con la Edad

Se realizó un análisis de correlación para determinar la relación de la edad con la concentración de proteína obtenida. Como se puede apreciar en la Figura 9 y la Tabla 10, tomando en consideración el peso húmedo cristaliniano, se puede apreciar que la concentración de proteína tiende a disminuir a medida que la edad aumenta, con un coeficiente de correlación también muy bajo ($R^2 = 0.046$)

Figura 9

Análisis de Correación de la Edad con la Concentración de Proteína Cristaliniana



Concentración de proteína total por miligramo de peso húmedo cristaliniano

Tabla 10

Análisis de Correlación de la Edad con la Concentración de Proteína Cristaliniana

	Concentración de Proteína Total por Miligramo de Peso
Pendiente	0.0015
Intersección con el eje Y	0.18
Intersección con el eje X	121.3
Ecuación	$Y = 0.0015 * X + 0.18$
R^2	0.046

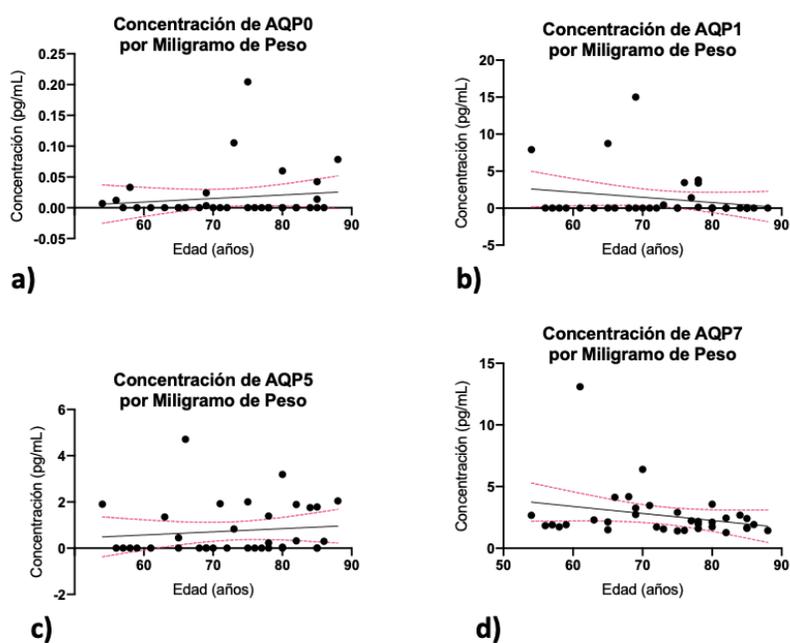
Nota: R^2 = Coeficiente de Correlación de Pearson

La Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 no tiene Relación con la Edad

De igual manera, se realizó un análisis de correlación para determinar la relación de la edad con la concentración de cada AQP valorada. Como puede apreciarse en la Figura 10 y en la Tabla 11, la relación entre la edad y las concentraciones de AQP0 y AQP5 que a mayor edad mayor concentración de éstas, aunque con un coeficiente de correlación muy bajo ($R^2 = 0.018$ y 0.013 , respectivamente). Por otro lado, la relación entre la edad y las concentraciones de AQP1 y AQP7 fue que a mayor edad mejor concentración de las mismas, nuevamente con un coeficiente de correlación muy bajo ($R^2 = 0.044$ y 0.070 , respectivamente).

Figura 10

Análisis de Correlación de la Edad con la Concentración de Acuaporinas



a) Concentración de AQP0 por miligramo de peso, b) Concentración AQP1 por miligramo de peso, c) Concentración de AQP5 por miligramo de peso, d) Concentración de AQP7 por miligramo de peso

Tabla 11

Análisis de Correlación de la Edad con Concentración de Acuaporinas

	AQP0	AQP1	AQP5	AQP7
Pendiente	0.00057	-0.069	0.013	-0.057
Intersección con el eje Y	-0.024	6.32	-0.024	6.83
Intersección con el eje X	43.63	91.32	18.19	119.2
Ecuación de la línea	$Y = 0.00057 * X - 0.024$	$Y = 0.069 * X + 6.32$	$Y = 0.013 * X - 0.024$	$Y = -0.057 * X + 6.83$
R^2	0.018	0.044	0.013	0.070

Nota: R^2 = Coeficiente de Correlación de Pearson

La Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 no Difiere con Respecto al Género

Se realizó un análisis de la concentración de las cuatro acuaporinas estudiadas con respecto al género de los pacientes. Como puede apreciarse en la Figura 11 y la Tabla 12, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de cada acuaporina en relación con el género.

Figura 11

Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 con Respecto al Género

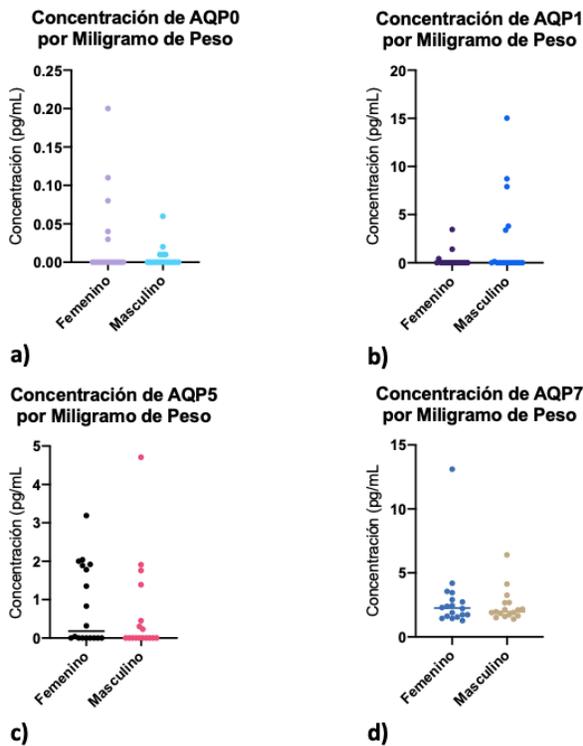


Tabla 12

Estadística Inferencial del Género con Respecto las Concentraciones de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7

Variable	Grupos Comparados	Prueba Utilizada	Valor de p	Interpretación Estadística
AQP0	Hombres y Mujeres	Mann Whitney	0.74	No diferentes
AQP1	Hombres y Mujeres	Mann Whitney	0.13	No diferentes
AQP5	Hombres y Mujeres	Mann Whitney	0.31	No diferentes
AQP7	Hombres y Mujeres	Mann Whitney	0.77	No diferentes

La Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 no Difiere con Respecto a la Comorbilidad Sistémica

Se realizó la comparación estadística de la concentración de cada acuaporina con respecto a los grupos de comorbilidad sistémica antes mencionados. Como puede observarse en la Figura 12 y Tabla 13, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes sanos con los pacientes diabéticos e hipertensos para ninguna acuaporina

Figura 12

Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 con Respecto a la Comorbilidad Sistémica

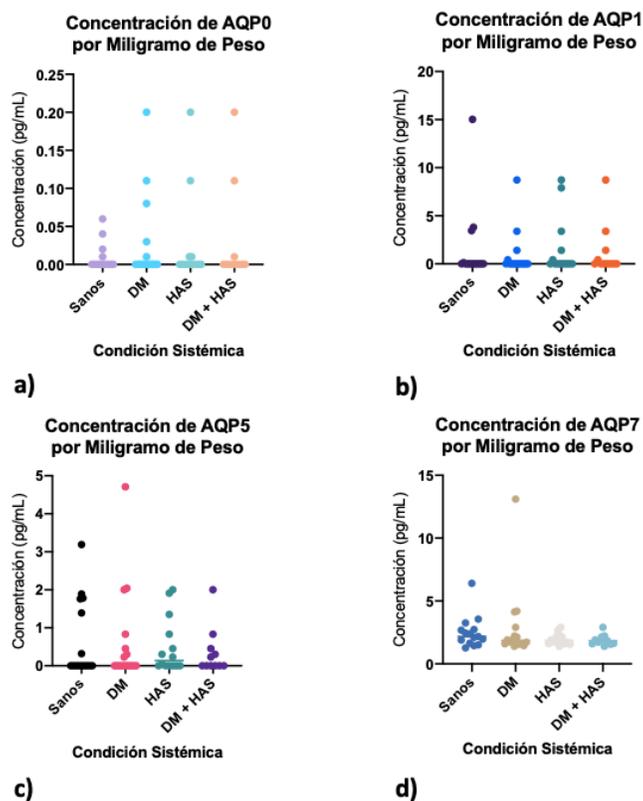


Tabla 13

Estadística Inferencial del Género con Respecto las Concentraciones de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7

Variable	Grupos Comparados	Prueba Utilizada	Valor de p	Interpretación Estadística
AQP0	Sanos y DM	Mann Whitney	0.61	No diferentes
	Sanos y HAS	Mann Whitney	0.85	No diferentes
	Sanos y DM + HAS	Mann Whitney	0.78	No diferentes
	DM y HAS	Mann Whitney	0.78	No diferentes
AQP1	Sanos y DM	Mann Whitney	0.81	No diferentes
	Sanos y HAS	Mann Whitney	0.66	No diferentes
	Sanos y DM + HAS	Mann Whitney	0.73	No diferentes

Variable	Grupos Comparados	Prueba Utilizada	Valor de p	Interpretación Estadística
AQP5	Sanos y DM	Mann Whitney	0.96	No diferentes
	Sanos y HAS	Mann Whitney	0.76	No diferentes
	Sanos y DM + HAS	Mann Whitney	0.86	No diferentes
AQP7	Sanos y DM	Mann Whitney	0.50	No diferentes
	Sanos y HAS	Mann Whitney	0.21	No diferentes
	Sanos y DM + HAS	Mann Whitney	0.14	No diferentes

Nota: DM = diabetes mellitus, HAS = hipertensión arterial sistémica, DM + HAS = diabéticos e hipertensos

La Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 no Difiere con Respecto a la Lateralidad de la Catarata

Nuevamente se realizó una comparación estadística de las cuatro acuaporinas esta vez con respecto a la lateralidad de la catarata. Como puede apreciarse en la Figura 13 y Tabla 14, no hubo diferencias estadísticamente significativas para ninguna acuaporina con respecto a la lateralidad de la catarata.

Figura 13

Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 con Respecto a la Lateralidad de la Catarata

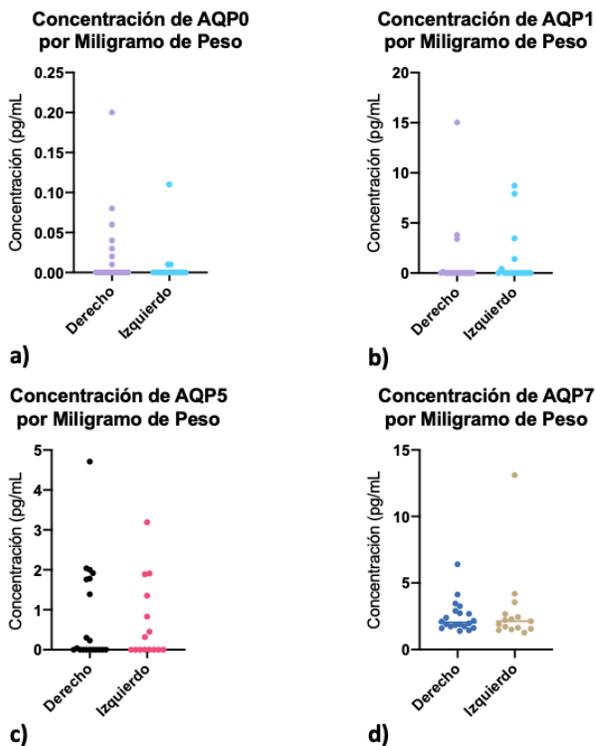


Tabla 14

Estadística Inferencial de la Lateralidad de la Catarata con Respecto las Concentraciones de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7

Variable	Grupos Comparados	Prueba Utilizada	Valor de p	Interpretación Estadística
AQP0	Derecho e Izquierdo	Mann Whitney	0.29	No diferentes
AQP1	Derecho e Izquierdo	Mann Whitney	0.39	No diferentes
AQP5	Derecho e Izquierdo	Mann Whitney	0.81	No diferentes
AQP7	Derecho e Izquierdo	Mann Whitney	0.71	No diferentes

La Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 no Difiere con Respecto a la Dureza de la Catarata

Debido a que el reporte de la opalescencia y color del universo estudiado fue la misma para los pacientes, en este apartado se englobarán como “dureza”. Como puede observarse en la Figura 14 y Tabla 15, la concentración de las cuatro acuaporinas no tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la dureza de la catarata, sin embargo, AQP5 mostró una tendencia a la diferencia estadística ($p=0.07$).

Figura 14

Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 con Respecto a la Dureza de la Catarata

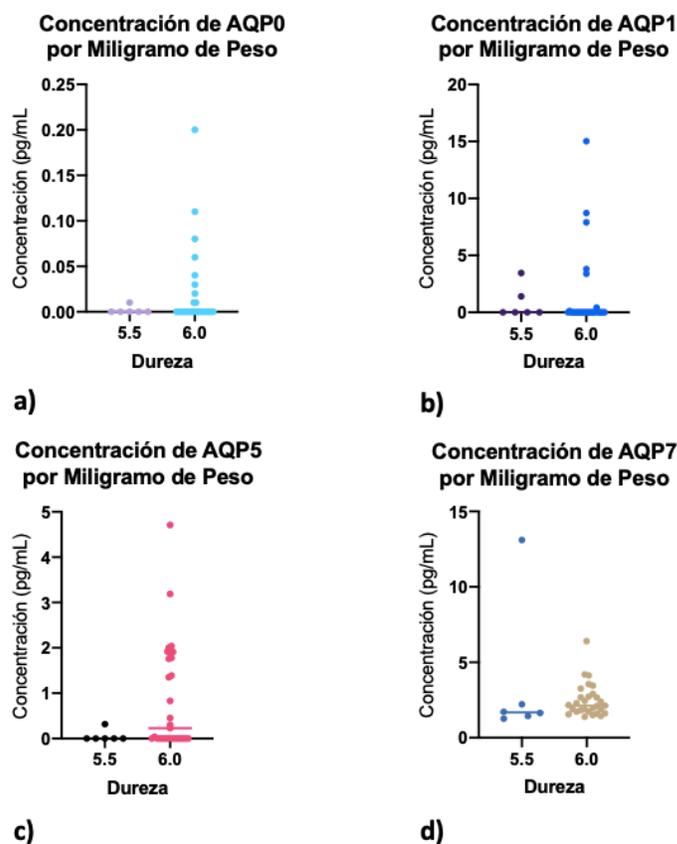


Tabla 15

Estadística Inferencial de la Dureza de la Catarata con Respecto las Concentraciones de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7

Variable	Grupos Comparados	Prueba Utilizada	Valor de p	Interpretación Estadística
AQP0	5.5 y 6.0*	Mann Whitney	0.41	No diferentes
AQP1	5.5 y 6.0*	Mann Whitney	0.87	No diferentes
AQP5	5.5 y 6.0*	Mann Whitney	0.07	No diferentes
AQP7	5.5 y 6.0*	Mann Whitney	0.22	No diferentes

* Clasificación clínica LOCS 3. En el grupo estudiado, opalescencia y color tienen el mismo resultado

La Concentración de Acuaporinas no Difiere con Respecto a la Comorbilidad Oftalmológica

Se realizó la comparación estadística de la concentración de las cuatro acuaporinas con respecto a la comorbilidad oftalmológica. Como puede apreciarse en la Figura 15 y la Tabla 16, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de las cuatro acuaporinas entre pacientes sin comorbilidad oftalmológica con aquellos con retinopatía diabética. No obstante, la concentración de AQP5 mostró una tendencia a la diferencia ($p=0.054$)

Figura 14

Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 con Respecto a la Comorbilidad Oftalmológica

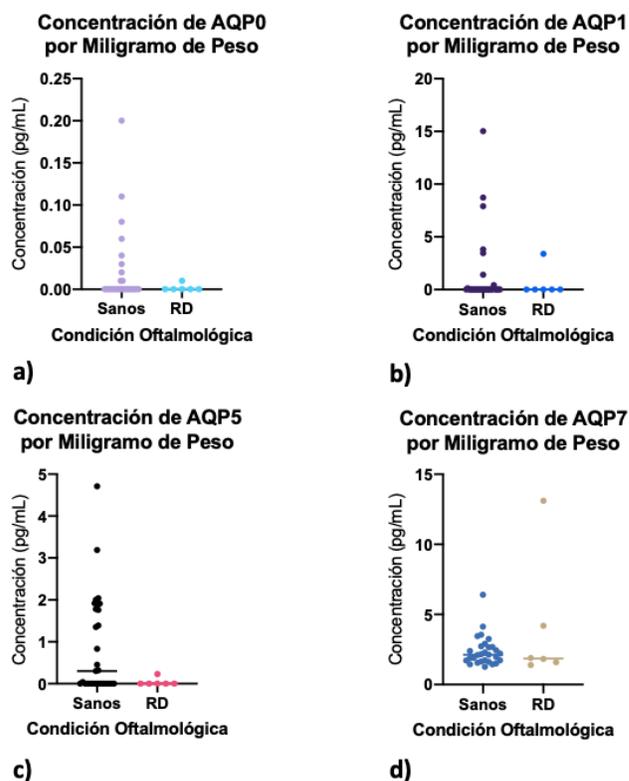


Tabla 16

Concentración de AQP0, AQP1, AQP5 y AQP7 con Respecto a la Comorbilidad Oftalmológica

Variable	Grupos Comparados	Prueba Utilizada	Valor de p	Interpretación Estadística
AQP0	Sanos y RD	Mann Whitney	0.41	No diferentes
AQP1	Sanos y RD	Mann Whitney	0.54	No diferentes
AQP5	Sanos y RD	Mann Whitney	0.054	No diferentes
AQP7	Sanos y RD	Mann Whitney	0.87	No diferentes

Nota: RD = retinopatía diabética

Discusión

En este estudio se obtuvieron 35 muestras correspondientes a 18 hombres y 17 mujeres con edad promedio de 72 años con catarata madura. Los resultados de este estudio muestran que la concentración de proteína total y de las cuatro acuaporinas estudiadas no tiene relación con la edad, género, antecedente de diabetes mellitus o hipertensión sistémica. Adicionalmente, tampoco se demostraron diferencias con respecto a la lateralidad de la catarata, la opalescencia y coloración estimada clínicamente y tampoco con respecto a retinopatía diabética. En general, la concentración de acuaporinas fue muy cercana a cero en la mayoría de los pacientes a excepción de AQP7.

La gran mayoría de la literatura con respecto al rol de las acuaporinas en la génesis de catarata ha sido obtenida gracias a modelos animales en donde se inducen mutaciones genéticas que tienen como resultado la formación de catarata y existen poco estudios que describen el perfil proteico o proteómico de la catarata senil.

Similar a lo obtenido en este estudio, Horwitz y Wong describieron mediante estudios proteicos que, a medida que el cristalino envejece, tanto el término carboxílico como el amino de AQP0 sufren proteólisis, formando un a proteína de desecho llamada MP22, demostrando una forma en que la concentración, y por ende, la función de AQP0 puede disminuir a medida que el cristalino envejece (35). Además, se han demostrado otros mecanismos para la degradación paulatina de AQP0 como la fosforilación del término carboxílico que disminuye su tráfico hacia la membrana plasmática (36). También, se ha demostrado que la glucosilación de AQP0 disminuye su capacidad de interactuar con calmodulina, afectando la regulación de su permeabilidad y aumentando la opacificación del cristalino, como puede ocurrir en pacientes diabéticos (37).

Modelos animales de catarata han identificado numerosos residuos de importancia en la función y transporte de AQP0 y han ayudado a caracterizar las funciones únicas de AQP0 (38-40). Por ejemplo, ratones con delección de AQP0 tienen catarata, embalaje celular desorganizado, y propiedades ópticas alteradas (41, 42) donde la expresión de AQP1 en estos ratones no restaura la transparencia o arquitectura celular, lo cual evidencia la importancia de las funciones únicas e imprescindibles de AQP0 (39).

Otros estudios en ratones con delección del gen AQP1 mostraron que pese a la ausencia de esta proteína no tiene repercusión en la morfología cristaliniana, sin embargo, estos órganos tuvieron una menor permeabilidad al agua, mostrando con un mayor contenido de agua basal y una menor capacidad de respuesta homeostática cuando se incubación en soluciones hipotónicas, por lo que tuvieron una deficiencia para contrarrestar el edema celular (22).

La función de AQP5 se ha descrito sobre todo en el epitelio cristaliniano, por lo que su función en las fibras es aún desconocida. En modelos murinos, la delección de AQP5 causa catarata en condiciones de hiperglucemia, proponiendo una función importante de esta molécula en diabetes mellitus (43). En este estudio, la concentración de AQP5 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre cristalinios de ojos sanos aquellos con retinopatía diabética, pero sí reveló una tendencia a la diferencia donde la concentración de AQP5 fue mayor en ojos sanos. De igual manera, AQP5 mostró una tendencia a la diferencia estadística con respecto a la dureza de la catarata.

Adicionalmente, se ha sugerido que la translocación de AQP5 a la membrana celular podría aumentar la permeabilidad del cristalino al agua para compensar por la translocación de AQP0 al constituir uniones celulares (17), condición que no fue evidente en este estudio.

Hasta la fecha, no se ha caracterizado el papel de AQP7 en el cristalino, aunque se piensa que podría permitir el transporte de pequeñas moléculas (3, 13). En este estudio, AQP7 fue la proteína con mayor concentración en todos los grupos de pacientes con catarata madura. Al ser

una gliceroacuaporina, es posible que su permeabilidad a glicerol tenga un papel importante en el mantenimiento de este tejido en degradación.

Por otro lado, se ha demostrado que las acuaporinas en el cristalino actúan como peroxiporinas, es decir que permiten la difusión de peróxido de hidrogeno a través de ellas, proporcionando una vía de excreción de especies reactivas de oxígeno fuera del cristalino (44). En consecuencia, la disminución en la concentración y/o función de acuaporinas podría ser causante de un círculo vicioso en el que, además de ser menos capaz de regular el flujo de agua, el cristalino se vuelve incompetente para eliminar estos agentes de estrés oxidativo provocado por la exposición a la luz y el metabolismo celular, aunado a una disminución de los mecanismos compensadores antioxidantes característicos del envejecimiento.

Además, se ha demostrado en tejido bovino que las fibras cristalinas cuentan con proteasomas, que son complejos proteicos con capacidad proteolítica altamente específica dependiente de ubiquitinización (45). En el cristalino, la actividad del proteasoma se ve incrementada por el estrés oxidativo (46, 47), el cual se piensa que es uno de los principales factores que influyen en la génesis de la catarata senil. De esta manera, el estrés oxidativo causaría de manera indirecta una estimulación de la degradación de acuaporinas, proporcionando mayor sustento para la disminución de su concentración y función en relación a la senescencia.

Conclusiones

Este estudio tiene como fortalezas el diseño experimental, que ha sido meticuloso desde la procuración de las muestras biológicas con red de frío y con el uso de inhibidos de proteasas. Adicionalmente, el análisis de datos fue cuidadoso buscando intencionadamente sesgos relacionados con la edad y otras condiciones clínicas. La concentración de proteína fue controlada con el peso húmedo del cristalino, lo cual también redujo sesgos propiciados por variaciones en el tamaño de la muestra. Adicionalmente, no hay en la literatura internacional ningún otro estudio que describa el perfil de proteína total cristaliniiana ni de las cuatro acuaporinas estudiadas en en catarata madura.

Una potencial debilidad de este estudio es que el cálculo de muestra se basó en un tamaño de muestra de 16 cristalinos, para comparaciones de dos grupos por variable, es decir 8 individuos por grupo a estudiar. Esta condición no se cumplió para los pacientes con retinopatía diabética. Indiscutiblemente, incrementar el tamaño de la muestra permitiría realizar comparaciones más confiables con respecto a la retinopatía diabética en catarata, pero también identificar diferencias con efectos menores a 0.7 en todas las condiciones estudiadas.

Otra potencial debilidad de este estudio es que la cuantificación de proteína fue realizada mediante espectrofotometría con Nanodrop. Este método de medición fue diseñado en principio para la cuantificación de proteínas purificadas de las que se conoce su coeficiente de extinción proteica. Para una adecuada estimación de la concentración proteica, este coeficiente debe determinarse para cada muestras tisular, por lo que habría sido ideal realizar dicha cuantificación mediante métodos más exactos como el ensayo de Bradford o de Lowry que sí están diseñados para muestras proteicas como las utilizadas en este estudio. Sin embargo este método es conveniente porque utiliza sólo 2 microlitros de muestra lo que disminuye el desperdicio de la muestra, no requiere otros reactivos por lo que resulta barato y es técnicamente fácil de realizar, y en consecuencia reproducible.

Por otro lado, se utilizó el sobrenadante de las muestras titulares para realizar la cuantificación acuaporinas. Aunque los ensayos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante, las acuaporinas son proteínas liposolubles que se encuentran en la membrana plasmática, por lo que cabe la posibilidad de que la medición de estas proteínas haya sido subóptimas. Lo anterior puede ser una motivación para el desarrollo de técnicas de laboratorio que permitan enriquecer la abundancia de proteínas no solubles como las acuaporinas.

Adicionalmente, y pese a que la identificación y cuantificación de estas proteínas mediante ensayos ELISA es técnicamente fácil, dista mucho de ser ideal debido a que el protocolo implica la utilización de volúmenes relativamente altos de muestra tisular, lo cual dificulta la replicación de estos experimentos con las mismas muestras biológicas en el futuro. La identificación y cuantificación de proteínas por medio de Western Blot, por ejemplo, facilitaría la medición de múltiples proteínas con sólo una fracción del volumen que se utiliza en los ensayos ELISA y también sería más específico. Sin embargo, este método requiere de un gran número de pasos, entrenamiento, destreza técnica, tiempo e infraestructura con la que actualmente no se cuenta en el Centro de Investigación Biomédica.

Además, es importante considerar dentro de las limitaciones de este estudio, la ausencia de un grupo control de cristalinos sin catarata o con catarata no madura. Este hecho resulta éticamente complicado debido a que la extracción del núcleo cristaliniiano requiere de una incisión quirúrgica de al menos 10 mm y debido al advenimiento de la facoemulsificación, se reserva para cataratas especialmente duras que impliquen un mayor riesgo de complicaciones quirúrgicas o postquirúrgicas de esta técnica. Sería éticamente incorrecto realizar esta técnica quirúrgica más cruenta con el único objetivo de obtener un núcleo íntegro. Adicionalmente, este estudio careció de un control interno que verificara que las mediciones obtenidas, como pudo ser el caso de la cuantificación de actina u otra proteína estructural del cristalino.

En conclusión, los resultados obtenidos apoyan la teoría general de que la fisiopatología de la catarata se acompaña de una disminución de su permeabilidad al agua y probablemente especies reactivas de oxígeno, donde el estrés oxidativo a su vez propicia un aumento en los mecanismos de degradación de estos canales transmembrana, dando sustento a un círculo vicioso que da como resultado la pérdida de transparencia de este órgano refractivo.

Considerando estos hechos, la consecuencia directa de un menor flujo de agua sería la disminución de la difusión de glucosa y oxígeno a las fibras cristalinas, además de una dificultad importante para la eliminación de piruvato y otros productos del metabolismo celular, incrementando exponencialmente el daño causado por el estrés oxidativo y comprometiendo la integridad y función de las fibras cristalinas. Sin embargo, hay aún mucho que investigar con respecto a los mecanismos que dan lugar a estos fenómenos y cómo proporcionar un tratamiento que logre disminuir o retrasar el daño tisular cristalino generado por el envejecimiento.

Bibliografia

1. Hejtmancik JF, Shiels A. Overview of the Lens. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:119-27.
2. Schachar RA. The mechanism of accommodation and presbyopia. *Int Ophthalmol Clin.* 2006;46(3):39-61.
3. Schey KL, Wang Z, J LW, Qi Y. Aquaporins in the eye: expression, function, and roles in ocular disease. *Biochimica et biophysica acta.* 2014;1840(5):1513-23.
4. Jacob TJ. The relationship between cataract, cell swelling and volume regulation. *Progress in retinal and eye research.* 1999;18(2):223-33.
5. Hachez C, Chaumont F. Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels. *Advances in experimental medicine and biology.* 2010;679:1-17.
6. Zeidel ML. Water homeostasis: evolutionary medicine. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association.* 2012;123:93-105; discussion 6.
7. Ishibashi K, Morishita Y, Tanaka Y. The Evolutionary Aspects of Aquaporin Family. *Advances in experimental medicine and biology.* 2017;969:35-50.
8. Li C, Wang W. Molecular Biology of Aquaporins. *Adv Exp Med Biol.* 2017;969:1-34.
9. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* 1992;256(5055):385-7.
10. Agre P. Nobel Lecture. Aquaporin water channels. *Bioscience reports.* 2004;24(3):127-63.
11. Rojek A, Praetorius J, Frokiaer J, Nielsen S, Fenton RA. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annual review of physiology.* 2008;70:301-27.
12. Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, Nagelhus EA, Ottersen OP, Agre P, et al. Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *The American journal of physiology.* 1998;274(5 Pt 1):C1332-45.
13. Tran TL, Bek T, Holm L, la Cour M, Nielsen S, Prause JU, et al. Aquaporins 6-12 in the human eye. *Acta ophthalmologica.* 2013;91(6):557-63.
14. Kumari SS, Varadaraj M, Yerramilli VS, Menon AG, Varadaraj K. Spatial expression of aquaporin 5 in mammalian cornea and lens, and regulation of its localization by phosphokinase A. *Molecular vision.* 2012;18:957-67.
15. Grey AC, Walker KL, Petrova RS, Han J, Wilmarth PA, David LL, et al. Verification and spatial localization of aquaporin-5 in the ocular lens. *Experimental eye research.* 2013;108:94-102.
16. Patil RV, Saito I, Yang X, Wax MB. Expression of aquaporins in the rat ocular tissue. *Experimental eye research.* 1997;64(2):203-9.
17. Wang Z, Han J, Schey KL. Spatial differences in an integral membrane proteome detected in laser capture microdissected samples. *Journal of proteome research.* 2008;7(7):2696-702.
18. Grey AC, Li L, Jacobs MD, Schey KL, Donaldson PJ. Differentiation-dependent modification and subcellular distribution of aquaporin-0 suggests multiple functional roles in the rat lens. *Differentiation; research in biological diversity.* 2009;77(1):70-83.
19. Zampighi GA, Eskandari S, Hall JE, Zampighi L, Kreman M. Micro-domains of AQP0 in lens equatorial fibers. *Experimental eye research.* 2002;75(5):505-19.
20. Simon SA, Zampighi G, McIntosh TJ, Costello MJ, Ting-beall HP, Robertson JD. The structure of junctions between lens fiber cells. *Bioscience reports.* 1982;2(5):333-41.
21. Gonen T, Cheng Y, Kistler J, Walz T. Aquaporin-0 membrane junctions form upon proteolytic cleavage. *Journal of molecular biology.* 2004;342(4):1337-45.
22. Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Accelerated cataract formation and reduced lens epithelial water permeability in aquaporin-1-deficient mice. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2006;47(9):3960-7.
23. Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ, Agre P. Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science.* 1994;265(5178):1585-7.

24. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(29):20071-4.
25. Varadaraj K, Kumari SS, Patil R, Wax MB, Mathias RT. Functional characterization of a human aquaporin 0 mutation that leads to a congenital dominant lens cataract. *Experimental eye research*. 2008;87(1):9-21.
26. Senthil Kumar G, Kyle JW, Minogue PJ, Dinesh Kumar K, Vasantha K, Berthoud VM, et al. An MIP/AQP0 mutation with impaired trafficking and function underlies an autosomal dominant congenital lamellar cataract. *Experimental eye research*. 2013;110:136-41.
27. Hu S, Wang B, Qi Y, Lin H. The Arg233Lys AQP0 mutation disturbs aquaporin0-calmodulin interaction causing polymorphic congenital cataract. *PloS one*. 2012;7(5):e37637.
28. Berry V, Francis P, Kaushal S, Moore A, Bhattacharya S. Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant 'polymorphic' and lamellar cataracts linked to 12q. *Nature genetics*. 2000;25(1):15-7.
29. Francis P, Chung JJ, Yasui M, Berry V, Moore A, Wyatt MK, et al. Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts. *Human molecular genetics*. 2000;9(15):2329-34.
30. Geyer DD, Spence MA, Johannes M, Flodman P, Clancy KP, Berry R, et al. Novel single-base deletional mutation in major intrinsic protein (MIP) in autosomal dominant cataract. *American journal of ophthalmology*. 2006;141(4):761-3.
31. Gu F, Zhai H, Li D, Zhao L, Li C, Huang S, et al. A novel mutation in major intrinsic protein of the lens gene (MIP) underlies autosomal dominant cataract in a Chinese family. *Molecular vision*. 2007;13:1651-6.
32. Wang W, Jiang J, Zhu Y, Li J, Jin C, Shentu X, et al. A novel mutation in the major intrinsic protein (MIP) associated with autosomal dominant congenital cataracts in a Chinese family. *Molecular vision*. 2010;16:534-9.
33. Jiang J, Jin C, Wang W, Tang X, Shentu X, Wu R, et al. Identification of a novel splice-site mutation in MIP in a Chinese congenital cataract family. *Molecular vision*. 2009;15:38-44.
34. Jin C, Jiang J, Wang W, Yao K. Identification of a MIP mutation that activates a cryptic acceptor splice site in the 3' untranslated region. *Molecular vision*. 2010;16:2253-8.
35. Horwitz J, Wong MM. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate of the main intrinsic polypeptides isolated from human and bovine lens plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1980;622(1):134-43.
36. Ball LE, Garland DL, Crouch RK, Schey KL. Post-translational modifications of aquaporin 0 (AQP0) in the normal human lens: spatial and temporal occurrence. *Biochemistry*. 2004;43(30):9856-65.
37. Swamy-Mruthinti S. Glycation decreases calmodulin binding to lens transmembrane protein, MIP. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1536(1):64-72.
38. Shiels A, Mackay D, Bassnett S, Al-Ghoul K, Kuszak J. Disruption of lens fiber cell architecture in mice expressing a chimeric AQP0-LTR protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(14):2207-12.
39. Varadaraj K, Kumari SS, Mathias RT. Transgenic expression of AQP1 in the fiber cells of AQP0 knockout mouse: effects on lens transparency. *Experimental eye research*. 2010;91(3):393-404.
40. Watanabe K, Wada K, Ohashi T, Okubo S, Takekuma K, Hashizume R, et al. A 5-bp insertion in Mip causes recessive congenital cataract in KFRS4/Kyo rats. *PloS one*. 2012;7(11):e50737.
41. Al-Ghoul KJ, Kirk T, Kuszak AJ, Zoltoski RK, Shiels A, Kuszak JR. Lens structure in MIP-deficient mice. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2003;273(2):714-30.

42. Shiels A, Bassnett S, Varadaraj K, Mathias R, Al-Ghoul K, Kuszak J, et al. Optical dysfunction of the crystalline lens in aquaporin-0-deficient mice. *Physiological genomics*. 2001;7(2):179-86.
43. Sindhu Kumari S, Varadaraj K. Aquaporin 5 knockout mouse lens develops hyperglycemic cataract. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441(2):333-8.
44. Varadaraj K, Kumari SS. Lens aquaporins function as peroxiporins to facilitate membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;524(4):1025-9.
45. Jahngen JH, Lipman RD, Eisenhauer DA, Jahngen EG, Jr., Taylor A. Aging and cellular maturation cause changes in ubiquitin-eye lens protein conjugates. *Arch Biochem Biophys*. 1990;276(1):32-7.
46. Wagner BJ, Margolis JW, Garland D, Roseman JE. Bovine lens neutral proteinase preferentially hydrolyses oxidatively modified glutamine synthetase. *Exp Eye Res*. 1986;43(6):1141-3.
47. Shang F, Gong X, Taylor A. Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated. *J Biol Chem*. 1997;272(37):23086-93.