



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
Luis Guillermo Ibarra Ibarra

OFTALMOLOGÍA

**ESTUDIO DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LAS
PROTEÍNAS CRISTALINAS Y SU RELACIÓN CON LA
ENFERMEDAD DE CATARATA EN EL ADULTO MAYOR.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

OFTALMOLOGÍA

P R E S E N T A:

Dra. Ana Elsa Núñez Salgado.

PROFESOR TITULAR

Dra. Francisca Domínguez Dueñas.

ASESOR

Dra. Francisca Domínguez Dueñas.



Ciudad de México, Febrero 2018.



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.

ÍNDICE GENERAL

Índice General

Índice de Figuras

1. Introducción	
a. Introducción	4
b. Antecedentes	6
c. Planteamiento del problema	8
d. Justificación	8
e. Objetivos:	8
i. Objetivo general	
ii. Objetivos específicos	
2. Material y métodos:	10
a. Diseño del estudio	10
b. Metodología	
i. Estudio clínico de los pacientes	10
1. Criterios de inclusión de casos	
2. Criterios de inclusión de controles	11
3. Criterios de exclusión	11
4. Criterios de eliminación	11
5. Procedimientos	11
6. Variables	14
7. Análisis estadístico	17
ii. Análisis proteómico	17
iii. Análisis de la dinámica molecular teórica	17
c. Conflicto de intereses	19
d. Consideraciones éticas	20
3. Resultados	21
4. Discusión	31
5. Conclusiones	31
6. Bibliografía	32

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Cristalino.	4
Figura 2. Cristalinas.	5
Figura 3. Clasificación LOCS III.	13
Tabla 1. Variables.	14
Gráfica 1. Sexo	21
Gráfica 2. Ojos.	22
Gráfica 3. Tipo de cirugía.	22
Gráfica 4. Antecedentes Heredo-familiares.	23
Gráfica 5. Antecedentes Personales No Patológicos.	24
Gráfica 6. Antecedentes oftalmológicos.	24
Gráfica 7. Antecedentes Personales Patológicos.	25
Gráfica 8. Medicamentos.	25
Gráfica 9. Diagnóstico de ingreso.	26
Gráfica 10. Agudeza Visual.	27
Gráfica 11. Grado de opalescencia LOCS III.	28
Gráfica 12. Grado de color LOCS III.	28
Gráfica 13. Grado de cortical LOCS III.	29
Gráfica 14. Grado de posterior LOCS III.	29

Estudio de los cambios estructurales de las proteínas cristalinas y su relación con la enfermedad de catarata en el adulto mayor.

INTRODUCCIÓN

La catarata es la opacidad del cristalino del ojo y es la principal causa de ceguera en el mundo, es responsable de ~40-80% de los aproximadamente 45 millones de casos de ceguera que se producen en todo el mundo¹. Un estudio realizado en México en 2008, encontró que el 1.5% de la población mayor de 50 años es ciega por catarata². Existen distintas etiologías en la formación de catarata, sin embargo la más importante y frecuente es el envejecimiento.



Figura 1. Cristalino.

El cristalino permite enfocar objetos situados a diferentes distancias mediante un aumento o disminución funcional de su curvatura, y está formado por una muy alta concentración de proteínas, estas proteínas le confieren un índice de refracción muy elevado, dándole al ojo esa capacidad para refractar la luz.³

Las cristalinas comprenden más del 90% de las proteínas totales del cristalino de ojo y tienen la función de mantener la transparencia y proporcionar el índice de refracción

adecuado para enfocar los rayos de luz en la retina. Son proteínas de larga vida, es decir no se recambian a lo largo de la vida, son solubles en agua y su clasificación originalmente fue hecha por su habilidad para migrar en un campo eléctrico. Se clasifican en alfa, β , y gamma-cristalinas. La solubilidad y estabilidad de las cristalinas mantienen la transparencia del cristalino del ojo durante toda la vida.³

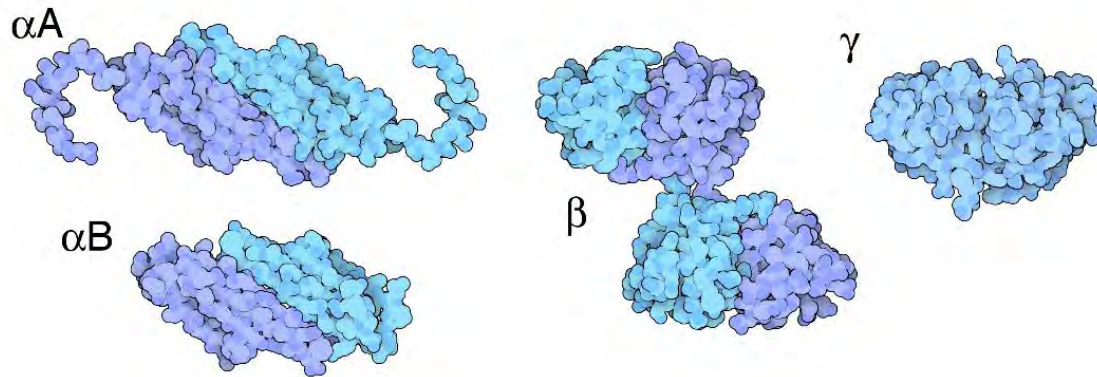


Figura 2. Cristalinas.

A medida que las personas envejecen, se observan distintas modificaciones bioquímicas de las cristalinas, tales como desamidación, truncamiento, oxidación, glicación, y metilación. Las transformaciones son importantes puesto que las proteínas del cristalino no se renuevan metabólicamente y conducen a cambios estructurales irreversibles. El cristalino se compone de una serie de fibras que representan diferentes edades, por lo que es un tejido atractivo para el estudio de los efectos del envejecimiento sobre la estructura y función de proteínas⁴.

Aunque el cristalino tiene mecanismos de protección para preservar su función, con el envejecimiento estos mecanismos comienzan a deteriorarse. Este fracaso conduce a la agregación gradual de las proteínas con una pérdida concomitante de la calidad óptica de la lente, y en última instancia conduce a la opacidad, o cataratas⁵.

Los cambios estructurales de las proteínas juegan un papel importante en la conversión de la proporción en gran parte soluble de cristalinas en insolubles con el envejecimiento. Los estudios sugieren que las mismas modificaciones reducen la actividad chaperona de la alfa cristalina. La incapacidad de la lente para retirar o reparar las cristalinas dañadas resulta en la acumulación y agregación de las proteínas modificadas. Estudios recientes muestran

que los fragmentos cristalina que se acumulan pueden tener un papel en la insolubilización de proteínas del cristalino⁴⁻⁷.

Las principales modificaciones en cristalinas del cristalino humano envejecido, son la desamidación y las modificaciones correspondientes de isomerización y racemización, sin embargo aún no se conoce cual es el papel de estas modificaciones en la formación de catarata⁴⁻⁷.

El objetivo de este proyecto es utilizar métodos proteómicos para caracterizar los cambios estructurales de las cristalinas en vivo. Se estudiarán cristalinos con catarata obtenidos de muestras de pacientes que sean candidatos a cirugía de catarata y se compararán con muestras de cristalinos transparentes obtenidos de pacientes candidatos a cirugía facorefractiva.

Además se correlacionaran los hallazgos con el estudio teórico de la dinámica molecular de las proteínas con simulaciones y métodos teóricos computacionales.

El conocimiento de la estructura y las interacciones de las cristalinas puede mejorar los métodos dirigidos a retardar la progresión de la agregación de proteínas y por lo tanto la dispersión de la luz en la formación de catarata. La modificación de proteínas y la agregación es el sello de envejecimiento del cristalino, y el control de estos dos eventos pueden ser una clave para frenar el proceso de envejecimiento⁸.

ANTECEDENTES

Hay tres familias distintas de cristalinas: alfa, beta y gama cristalinas. Las alfa y beta cristalinas existen como oligómeros y las gamma cristalinas permanecen monoméricas. Las alfa cristalinas son miembros de la familia de proteínas llamadas small heat shock y constituyen la mayor parte del citoplasma y el 50% de la proteínas del cristalino. El monómero de alfa-cristalinas tiene un peso molecular de 20kDa. En el humano las alfa cristalinas existen como hetero-oligómeros con un peso molecular de 800 kDa. Con dos subunidades alfaA y alfaB con una estequiometría 3:1. Estas proteínas tienen una actividad de chaperona, y se ha observado que pueden suprimir la agregación. Probablemente estas proteínas protegen a otras proteínas del cristalino de ser afectadas por calor, químicos e irradiación UV¹⁰.

La distribución espacial de los tres tipos de cristalinas es asimétrica. La región central del cristalino está constituida principalmente por beta y gama cristalinas y la región externa esta formada principalmente por las alfa cristalinas¹⁰.

Estas proteínas cristalinas están empaçadas como líquidos muy densos y ordenados de forma que poseen propiedades de transparencia y un índice refractivo adecuado y son un ejemplo perfecto de cómo la estructura define la función de las proteínas¹⁰.

Los mamíferos tienen siete subunidades **β -cristalinas**: tres de ellas con carácter básico (β B1, β B2, β B3) y 4 de ellas con carácter ácido (β A1, β A2, β A3, β A4). Estas β -cristalinas tienen un peso molecular de entre 23 y 28KDa. La abundancia relativa de las diferentes subunidades de β -cristalinas varía entre las diferentes especies. El humano casi no tiene subunidades β A2 y β B3. Las β -cristalinas se pliegan en formando cuatro motivos estructurales de tipo "llave griega" dejando a la proteína perfectamente bien empaçada en creando estructuras tipo β -sándwich⁶.

La desamidación es una modificación post-trasduccional muy común en las proteínas y se ha observado que es la modificación postraducciona l más importante en las β -cristalinas de los cristalinos envejecidos con catarata. Con la desamidación se convierte un grupo amida en un grupo ácido. Es decir, el aminoácido Asparagina (Asn, N) que a pH fisiológico es neutro, termina reemplazado o mutado por a un aminoácido Aspártico (Asp, D) que a pH fisiológico se encontrará cargado negativamente. Además el aminoácido Glutamina (Gln, Q) que también es polar y no cargado también puede desamidarse para formar el aminoácido Ácido Glutámico (Glu,E) que a pH fisiológico también se encontrará cargado negativamente. Esta modificaciones o mutaciones de los aminoácidos Asn y Gln, por aminoácidos Asp o Glu, introduce cargas negativas en la región hidrofóbica de la interface disminuyendo la estabilidad y correcto plegameinto de diferentes subunidades de β -cristalinas, particularmente de (β B1 y β A3)^{6,12-16}.

Se ha asociado la **desamidación de las β -cristalinas** con su precipitación y por tanto con la formación de cataratas. En particular se ha observado que las subunidades más propensas a sufrir estas modificaciones post-trasduccionales son las subunidades β B1 y β A3. Las β -cristalinas constituyen el 40% de las cristalinas del cristalino. Estas cristalinas se van modificando o mutando con la edad y por tanto se ha propuesto que juegan un papel muy importante en la formación de cataratas. En particular, la desamidación de las β -

cristalinas disminuye su estabilidad, promueve la agregación y altera las interacciones entre las diferentes proteínas cristalinas del cristalino^{6,11}.

Utilizando tecnología de proteómica 2LD MS/MS se encontró que el grado de desamidación en las cristalinas insolubles en agua fue mayor que en las fracciones solubles¹²⁻¹⁶. Esto apoya la hipótesis de que la desamidación se asocia con la precipitación de cristalinas¹²⁻¹⁶. De las desamidaciones detectados en la fracción de proteína insoluble, más de la mitad eran en β -cristalinas y, en particular, los β -subunidades β B1 y β A⁶.

La desamidación se ha demostrado que disminuye la estabilidad del β -cristalina, favorece la agregación de proteínas, modifica las interacciones cristalinas-cristalina, satura la función protectora chaperona de la α -cristalina, y alterar la estructura su estructura^{6,11}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las modificaciones estructurales que sufren las cristalinas durante la formación de catarata?

JUSTIFICACION

El conocimiento de la estructura y las interacciones de las cristalinas puede mejorar los métodos dirigidos a retardar la progresión de la agregación de proteínas y por lo tanto la dispersión de la luz en la formación de catarata.

La modificación de proteínas y la agregación es el sello de envejecimiento del cristalino, y su control puede ser una clave para frenar dicho proceso.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar las modificaciones postraduccionales de las cristalinas que intervienen en la formación de catarata con métodos proteómicos en vivo y con modelos teóricos computacionales de simulación de la dinámica molecular

Objetivos específicos

Cuantificar e identificar los sitios de desamidación de las beta-cristalinas que ocurren con el envejecimiento y la formación de catarata, tanto con modelos teóricos computacionales como con métodos proteómicos experimentales

Caracterizar el grado de isomerización y racemización de aminoácidos de la beta-cristalinas en las cataratas, tanto con modelos teóricos computacionales como con métodos proteómicos experimentales.

Describir cómo se lleva a cabo la agregación de las cristalinas con la finalidad de identificar factores que puedan evitar la formación de estos agregados y eventualmente la formación de cataratas.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Diseño del estudio: Prospectivo, transversal, descriptivo.

METODOLOGÍA

Este proyecto tendrá tres líneas. Una, el estudio clínico de los pacientes y la toma de muestra de cristalinos por medio de cirugía de catarata , segundo el análisis proteómico de las muestras de cristalinos tomadas de cirugía por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y tercera el estudio teórico de la dinámica molecular de las proteínas con métodos computacionales.

A) Estudio clínico de los pacientes

Lugar y duración: Servicio de Oftalmología Instituto Nacional de Rehabilitación. 6 meses

Investigador responsable: Dra. Francisca Domínguez Dueñas.

Población: Pacientes mexicanos mayores de 40 años con opacidad de cristalino candidatos a cirugía de facoemulsificación.

Método de muestreo: muestreo no probabilístico por conveniencia. Reclutamiento consecutivo.

Criterios de inclusión casos:

1. Pacientes mayores de 40 años.
2. De sexo masculino o femenino.
3. Con disminución de la capacidad visual clínicamente significativa menor de 20/40.
4. Con diagnóstico clínico de catarata senil en uno o ambos ojos.

Criterios de inclusión controles:

1. Pacientes mayores de 40 años
2. De sexo masculino o femenino
3. Programados para cirugía faco refractiva.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con Diabetes Mellitus
2. Cirugías oculares previas o tratamientos con láser.
3. Alguna otra patología ocular asociada a la catarata.

Criterios de eliminación:

1. Pacientes que no sean operados de cirugía del cristalino.

Se realizará la cirugía de catarata por la técnica de facoemulsificación por cirujano experto y se recolectará muestra del cristalino.

Procedimientos

Se seleccionarán 20 pacientes del servicio de oftalmología con diagnóstico de catarata que sean candidatos a cirugía de catarata y se les invitará a participar en el estudio; así como 20 pacientes controles candidatos a cirugía facorefractiva (cirugía con fines refractivos, en donde es removido el cristalino transparente con cirugía de facoemulsificación y se coloca un lente intraocular con el poder dióptrico adecuado para enfocar los rayos de luz en la retina).

Se realizará una historia clínica y revisión oftalmológica completa.

1) HISTORIA CLÍNICA.

- a) Ficha de identificación: Se tomarán los datos de identificación: Nombre, edad, género, lugar de nacimiento y lugar de residencia

- b) Anamnesis: Se realizará un interrogatorio dirigido y específico para identificar enfermedades asociadas:
- i) Antecedentes heredo-familiares.
 - ii) Antecedentes personales patológicos.
 - iii) Antecedentes oftalmológicos.
 - iv) Uso de medicación tópica o sistémica.
 - v) Padecimiento actual: Se preguntará la sintomatología del paciente; específicamente se interrogará sobre la evolución de la disminución de la visión.

2) EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA

- a) Agudeza visual/ Capacidad visual: Se efectuará la medición de la agudeza visual de ambos ojos y se realizará refracción utilizando el autorrefractó-queratómetro.
- b) Biomicroscopía. Exploración del segmento anterior con lámpara de hendidura para evaluar el grado de opacidad del cristalino, utilizando la clasificación de LOCS III (Lens Opacities Classification System. Para la clasificación de la opacidad del cristalino según el sistema de LOCS III, se les aplicará una gota de tropicamida con fenilefrina y a los 15 minutos una segunda dosis del medicamento para obtener una midriasis farmacológica mayor de 5 mm. Se procederá a exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura con una angulación del haz de luz a 45° con respecto al ojo y enfocando el sistema óptico a nivel del núcleo, para de esta forma poder graduar el color del núcleo (NC) y la opalescencia del núcleo (NO). El LOCS III tasa el NC y la NO, basándose en 6 imágenes tomadas en lámpara de hendidura. Para la catarata nuclear = C utiliza 5 imágenes tomadas por retroiluminación y otras 5 imágenes mediante esta misma iluminación para estratificar la subcapsular posterior = P. La severidad es tasada en una escala decimal^{3,4}.
- c) Oftalmoscopia posterior. Se realizará la evaluación del polo posterior bajo dilatación farmacológica con un lente aéreo de 78 D y se identificarán las características de la retina, de la mácula y de la papila o cabeza del nervio óptico.

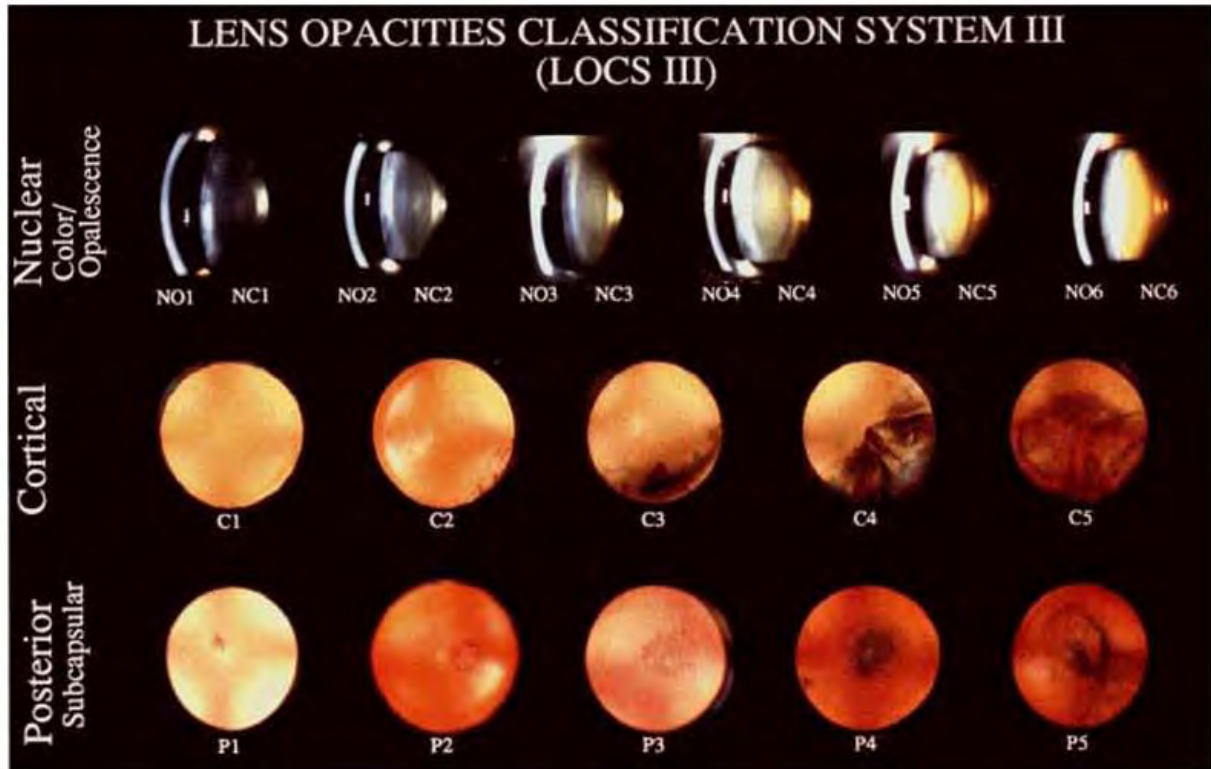


Figura 3. Clasificación LOCS III.

3) ESTUDIOS ESPECIALES.

Se medirá la densidad del núcleo del cristalino por densitometría con la cámara rotatoria de Scheimpflug, con el equipo PENTACAM, para tener una medición objetiva de la opacidad clínica del cristalino. Esta cámara rotatoria genera imágenes de Scheimpflug en 3 dimensiones, con una matriz fina de puntos en el centro de la rotación, tomadas como máximo en 2 segundos, generando una imagen completa del segmento anterior del ojo. El equipo genera un modelo en 3 dimensiones del segmento anterior a partir de 500 puntos reales de elevación. La densidad del cristalino se calcula midiendo la transmitancia de este y se le asigna una graduación que puede ir de 0% a 100%. La transmitancia es la luz que deja pasar un objeto cuando un rayo de luz incide a través de él. Un objeto diáfano dejaría pasar absolutamente toda la luz, la transmitancia en este caso es del 100% y la absorbancia es del 0%. La densidad relativa es una relación entre los niveles de grises y los niveles observados de grises, asumiendo que puede haber un máximo de 256 niveles de gris⁹.

El equipo permite obtener imágenes de secciones del cristalino muy bien enfocadas desde la cápsula anterior a la posterior, analizando la densidad en los diferentes puntos hasta en un centenar de radios, posibilitando el cálculo densitométrico casi tridimensional; brindando la posibilidad de revelar progresiones muy sutiles de las opacidades del cristalino en pequeños periodos de tiempo.

Se solicitarán exámenes y valoración preoperatoria por médico cardiólogo. Para ello se realizarán estudios de: Bimeometría hemática, química sanguínea, examen general de orina, tele de tórax, electrocardiograma.

4) CIRUGÍA DE FACOEMULSIFICACIÓN DEL CRISTALINO.

- a) Se realizará la técnica habitual de facoemulsificación por cirujano experto. Previa anestesia tópica con gotas de tetracaína, se realizarán dos incisiones en córnea clara, una de 1.5 mm y otra de 2.8 mm, se inyectará viscoelástico en cámara anterior y se realizará una capsulorrexis circular continua. Posteriormente se realizará la hidrodissección de la catarata y con la técnica de fractura de faco-chop se partirá el núcleo del cristalino en 4 sectores. Durante la partición de la catarata se tomará una muestra del cristalino y se extraerá por el puerto principal. Se almacenará a -80°C para su posterior análisis. Se termina la aspiración de restos corticales y se colocará el lente intraocular en bolsa capsular.

VARIABLES

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medida
Edad	Cuantitativa continua	Tiempo que ha vivido una persona	Años de vida del paciente	Números	Años
Sexo	Cualitativa dicotómica	Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas	Masculino o femenino	1/0	M/F

Antecedentes heredo-familiares	Cualitativa dicotómica	Enfermedades reportadas en familiares de 1er grado	Antecedentes referidos por el paciente sobre enfermedades en su familia	1/0	SI/NO
Antecedentes oftalmológicos	Cualitativa dicotómica	Enfermedades reportadas de patologías de los ojos	Antecedentes referidos por el paciente sobre enfermedades en los ojos	1/0	SI/NO
Antecedentes personales patológicos	Cualitativa dicotómica	Enfermedades diagnosticadas previamente	Enfermedades de los pacientes previa cirugía: diabetes, hipertensión, cardiopatía	1/0	SI/NO
Uso de medicamentos tópicos	Cualitativa dicotómica	Medicamentos aplicados directamente sobre la superficie ocular	Colirios referidos por los pacientes	1/0	SI/NO
Tiempo de evolución	Cuantitativa continua	Unidad de tiempo	Meses con la sintomatología	Números	Meses
Síntomas	Cuantitativa nominal	Molestias referidas de los pacientes con respecto a patología visual	Baja visual o alguna otra referida por los pacientes	Palabras	Baja visual
Agudeza visual	Cuantitativa ordinal	Parámetro que evalúa la capacidad del sistema visual para detectar y discriminar detalles de un objeto	Medida de la visión sin estenopeico	Números	20/20-20/400
Capacidad visual	Cuantitativa ordinal	Capacidad de nuestro sistema visual para discriminar detalles de los objetos en unas condiciones dadas	Medida de la visión con estenopeico	Números	20/20-20/400
Grado de Opalescencia (LOCS III)	Cuantitativa ordinal	Grado de difracción que aparece en sistemas muy dispersados, con poca opacidad	Grado de opacidad según clasificación LOCS III	Números	1-6
Grado de Color (LOCS III)	Cuantitativa ordinal	Grado de coloración del cristalino	Grado de color según clasificación LOCS III	Números	1-6

Grado de Cortical (LOCS III)	Cuantitativa ordinal	Grado de cortical de acuerdo a los meridianos involucrados e invasión al eje visual	Grado de catarata cortical según clasificación LOCS III	Números	1-5
Grado de Opacidad Posterior (LOCS III)	Cuantitativa ordinal	Grado de opacidad posterior	Grado de opacidad posterior según clasificación LOCS III	Números	1-5
Alteración retiniana	Cuantitativa dicotómica	Patología que involucre polo posterior o retina periférica	Enfermedades retinianas diagnosticadas	1/0	SI/NO
Densidad del núcleo PENTACAM	Cuantitativa continua	Relación entre la masa y el volumen de una sustancia, o entre la masa de una sustancia y la masa de un volumen igual de otra sustancia tomada como patrón.	Volumen del cristalino	Números	0-100
Longitud axial	Cuantitativa nominal	Distancia comprendida entre parte delantera del ojo y la parte posterior del ojo	Distancia comprendida entre parte delantera del ojo y la parte posterior del ojo	Números	0-100
Profundidad de la cámara anterior	Cuantitativa nominal	Longitud de la estructura del ojo que esta limitada por delante por la córnea y por detrás por el iris y el cristalino	Longitud de la cámara anterior del globo ocular	Números	0-10
Conteo endotelial	Cuantitativa nominal	Evaluación de la densidad (cel/mm ²), de la homogeneidad de los tamaños, de la alteración de las formas y del aspecto de las células del endotelio corneal	Número de células endoteliales por milímetro cuadrado	Números	0-100
Coeficiente de variabilidad	Cuantitativa nominal	Área celular principal dividida por el desvío medio del área de la célula principal	Número de variación entre las células endoteliales	Números	0-100
Glucosa	Cuantitativa nominal	Cantidad de glucosa en sangre	Cantidad de glucosa en sangre	Números	0-100

Creatinina	Cuantitativa nominal	Cantidad de creatinina en sangre	Cantidad de creatinina en sangre	Números	0-100
Urea	Cuantitativa nominal	Cantidad de urea en sangre	Cantidad de urea en sangre	Números	0-100
Nitrógeno ureico	Cuantitativa nominal	Cantidad de nitrógeno ureico en sangre	Cantidad de nitrógeno ureico en sangre	Números	0-100

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de las variables clínicas se utilizará: estadística descriptiva, utilizando frecuencia o porcentaje, para todas aquellas variables categóricas, y medidas de tendencia central y dispersión, para las variables cualitativas, utilizando media y desviación estándar para aquellas variables con distribución paramétrica y mediana e intervalo intercuartil para aquellas con distribución no paramétrica.

B) Análisis proteómico

Lugar y duración: Instituto Nacional de Medicina Genómica. 6 meses.

Investigador responsable: Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda.

Unidad de Observación: muestra de cristalinos extraídos por cirugía de facoemulsificación.

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas; de su estructura y de su función. La proteómica involucra una gran colección de diferentes técnicas y disciplinas que puedan contribuir al estudio de las proteínas. La espectrometría de masas (EM) se ha vuelto una metodología muy importante para analizar las muestras complejas de proteínas. La EM es una técnica analítica que mide la relación masa/carga de una molécula eléctricamente cargada y de esta forma se puede identificar, utilizando las secuencias disponibles en bases de datos del proteoma.

C) Análisis de la dinámica molecular teórica.

Lugar y duración: Facultad de química, Universidad Nacional Autónoma de México

Investigador responsable: Dra. Laura Domínguez Dueñas

Para estudiar **desde el punto de vista estructural y dinámico** qué le ocurre a las proteínas β -cristalinas tras su desamidación, en esta propuesta de investigación se propone estudiar con dinámica molecular los cambios estructurales que sufren dos de las subunidades principales de β -cristalinas de humano **β A4 y β B1**. En la actualidad los métodos teóricos y computacionales son herramientas esenciales para caracterizar, con precisión fisicoquímica y estructural, los sistemas complejos como las proteínas. Este trabajo de investigación incluye un estudio teórico-computacional, es decir, emplea metodologías teóricas para identificar cómo las modificaciones postraduccionales modifican la estructura y la dinámica de las beta-cristalinas, y cómo estas modificaciones pueden influir en su relación estructura-función.

La metodología teórica propuesta esta formada de cinco partes:

- (1) **En la primera parte** del proyecto se propone determinar la estructura, la dinámica, la solubilidad, y el potencial electrostático de la subunidad ácida β A4 de humano y de la subunidad básica β B1 de humano utilizando herramientas de la bioquímica computacional. Para esto se van a realizar simulaciones de dinámica molecular multiescala utilizando campos de fuerza que incluya (1) todos los átomos (AA) de la proteína para lograr una descripción atómica de las cristalinas y (2) además se utilizarán campos de fuerza de grano grueso (CG) para poder caracterizar la dinámica de las cristalinas con menos resolución pero durante mucho tiempo.
- (2) **En la segunda parte** del proyecto se propone realizar, las modificaciones post-traduccionales *in silico* (utilizando la misma metodología multiescala descrita en la primera parte del proyecto), de la subunidad ácida **β A4** de humano: Q62, Q64, Q65, N82 N113 para determinar estructuralmente cómo afectan estas desamidaciones a la estructura, dinámica, solubilidad y potencial electrostático de la proteína.
- (3) **En la tercera parte** se propone realizarlas modificaciones post-traduccionales in silico (utilizando también la misma metodología multiescala descrita en la primera parte del proyecto), de la subunidad básica **β B1** de humano: N15, N57, N67,

Q105, N107, N124, Q146, N157, N161, Q196, Q204, N216, Q222, Q224, Q226, Q235 para determinar estructuralmente cómo afectan estas desamidaciones a la estructura, dinámica, solubilidad y potencial electrostático de la proteína.

- (4) **En la cuarta parte** del proyecto se emplearan diferentes snapshots de los estudios de dinámica molecular para evaluar posibles sitios y modos de unión de fármacos obtenidos de bases de datos de moduladores e inhibidores de agregación, de forma que se pueda buscar reparar o aminorar los daños causados por las desamidaciones reportadas. Los complejos **β -cristalina–modulador** serán sometidos a estudios de dinámica molecular para evaluar su comportamiento en un tiempo de simulación determinado.
- (5) **En la quinta parte**, con base en la información anterior, se propondrán nuevos moduladores de la **β -cristalina** como potenciales agentes para el tratamiento de la catarata.

Las simulaciones de dinámica molecular AA se llevarán a cabo utilizando el campo de fuerza de CHARMM27 a presión, temperatura y número de partículas constante (NPT) y un paso de integración de 0.002 fs. La temperatura se mantendrá constante a 300K utilizando el termostato de Nose-Hoover y la presión se mantendrá constante isotrópicamente a 1 atm utilizando el Barostato de Parrinello-Rhman. El cálculo de las interacciones de no enlace se calcularán en un rango de 1.2 nm. Las interacciones electrostáticas se calcularán en un rango de 1.2 nm y a distancias mayores se aproximará con sumas de Ewald (PME). Las simulaciones de CG se llevarán a cabo con el campo de fuerzas de Martini2.2 y un paso de integración de 0.04 femtosegundos a presión y temperatura constantes utilizando el baróstatos y termostatos de Berendses. Las interacciones de no enlace se van a tratar de manera similar a las descritas para las simulaciones AA. Los estudios de acoplamiento molecular o Docking se realizarán con Auto-dock y Autodock-vina.

CONFLICTO DE INTERESES

Este estudio, no presenta ningún conflicto de interés, debido a que no recibe financiamiento por alguna empresa farmacéutica o relacionada con el ámbito de oftalmología. Los recursos humanos y materiales utilizados para la realización de éste, han sido financiados por los

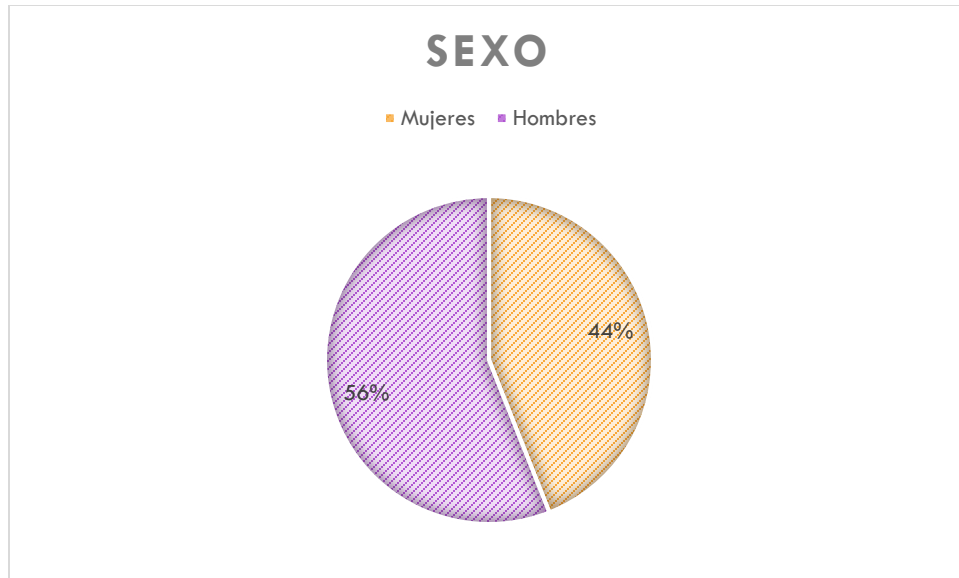
diferentes centros de investigación en los cuales se llevo a cabo. Ninguno de los participantes representa alguna casa de interés comercial, o representa algún interés fuera del propio conocimiento adquirido.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio, estuvo realizado bajo los principios bioéticos establecidos por la Declaración de Helsinki de la AMM (Asociación Médica Mundial), donde se establecen los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, aprobados por el comité de ética de las instituciones participantes.

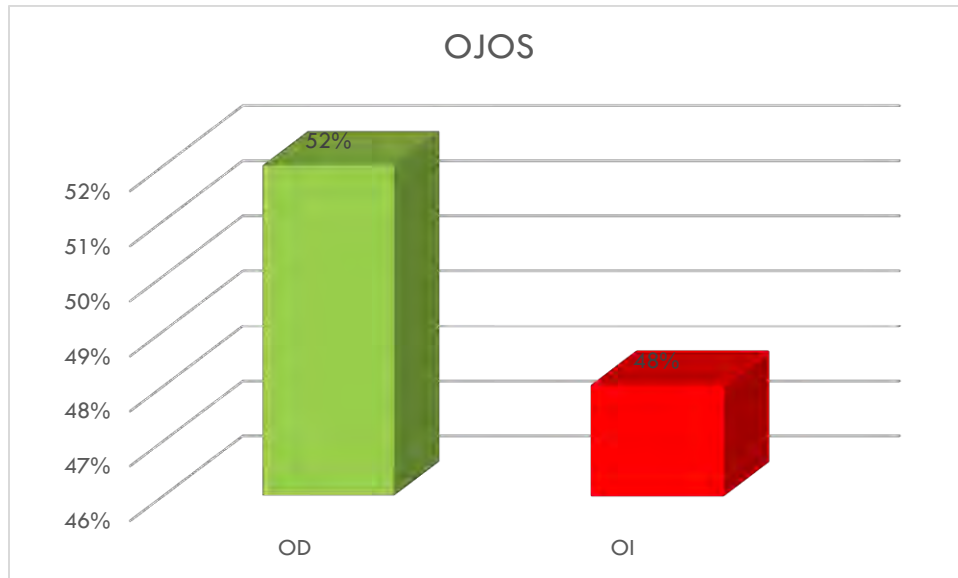
RESULTADOS

De los 25 pacientes recolectados dentro del grupo control, la media de edad es de 67.48 años, con una desviación estándar de ± 11.48 , con un mínimo de edad de 48 y máximo de 89 años. Del total de la muestra, el 44% (11 pacientes) son mujeres, y 56% (14 pacientes) son hombres; de los cuales, la media de edad para las mujeres fue de 70.18 DE ± 11.58 años, y para los hombres de 65.33 DE ± 12.43 años.

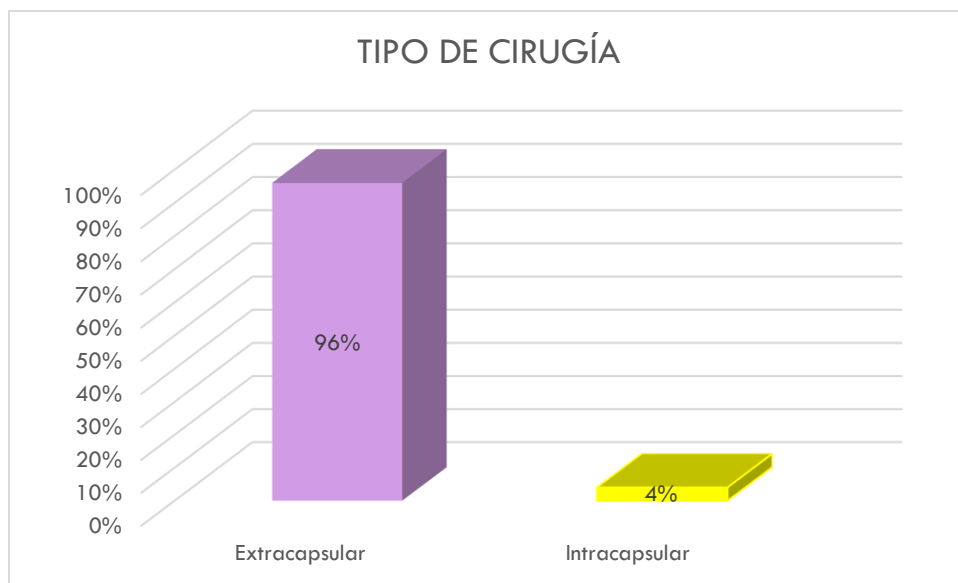


Gráfica 1. Sexo.

De los 25 ojos analizados, el 52% (13 ojos) son derechos, y el 48% (12 ojos) son izquierdos. Se extrajo la muestra del cristalino mediante la cirugía de catarata, en 24 ocasiones (96%) se realizó bajo la técnica de extracción extracapsular del cristalino y en 1 ocasión (4%) por medio de la técnica de extracción intracapsular. Se presentaron 4 complicaciones mediante esta técnica (16%), en 3 de los casos se presentó seidel posterior a la cirugía (12%) y en 1 caso se presentó un redespndimiento de retina (4%).



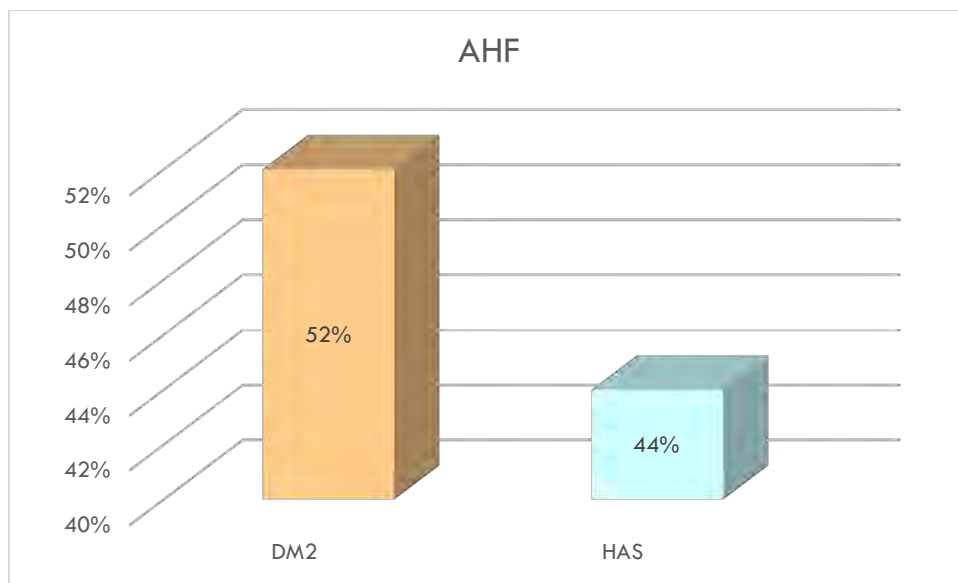
Gráfica 2. Ojos.



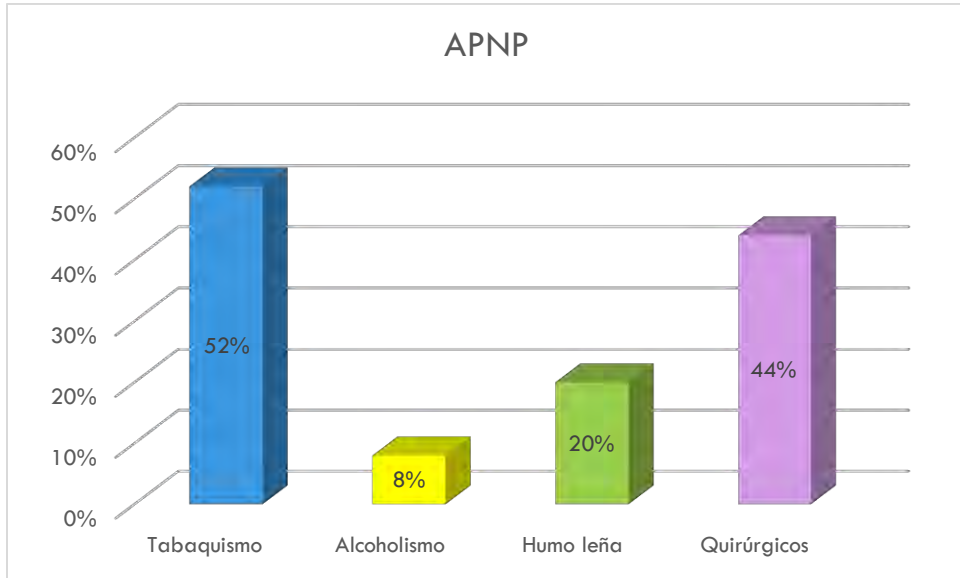
Gráfica 3. Tipo de cirugía.

Durante el interrogatorio, se preguntó sobre antecedentes heredofamiliares de diabetes mellitus, el cual se encontraba presente en el 52% de los casos (13 pacientes), hipertensión arterial 44% (11 pacientes), ninguno de los pacientes presentaba antecedentes familiares oftalmológicos de ceguera por alguna causa incluso desconocida o glaucoma. Se indagó sobre los antecedentes personales no patológicos, el tabaquismo fue positivo en un 52% (13 casos), alcoholismo positivo en 8% (2 casos), 20% (5 casos) con exposición a humo

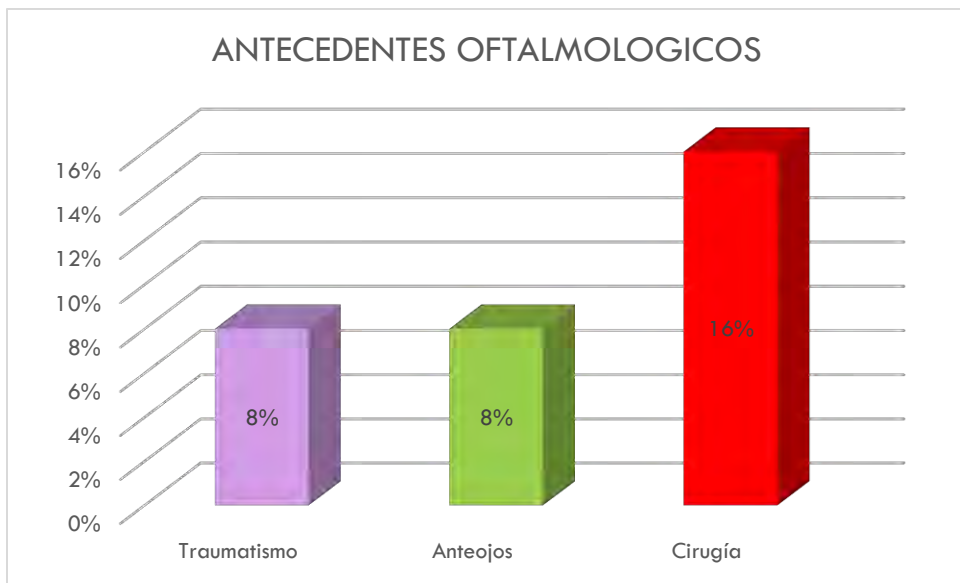
de leña, ningún paciente refirió toxicomanías, antecedente de traumatismo con involucro del globo ocular en 8% (2 casos), 8% con antecedente de usar lentes aéreos desde edades tempranas, 44% con antecedentes quirúrgicos (11 casos), y de éstos 16% (4 casos) con alguna cirugía oftalmológica, y solo 1 paciente presentó antecedente de fotocoagulación retiniana previa cirugía (4%); ningún paciente refirió medicación con colirios tópicos. Dentro de los antecedentes personales patológicos se investigó sobre diabetes mellitus en el 52% de los pacientes (13 pacientes), hipertensión en 48% (12 pacientes), 32% presentaba además otras comorbilidades (8 pacientes), 2 de ellos con enfermedad renal crónica, el resto con diversas enfermedades tales como cardiopatía isquémica o cáncer de próstata. El 68% utilizaban medicamentos sistémicos (17 pacientes), 8 de éstos (32%) utilizaban metformina, siendo el medicamento predominante en el grupo de pacientes, 5 pacientes (25%) utilizaban insulina, 5 pacientes (25%) utilizaban losartán, entre otros menos predominantes.



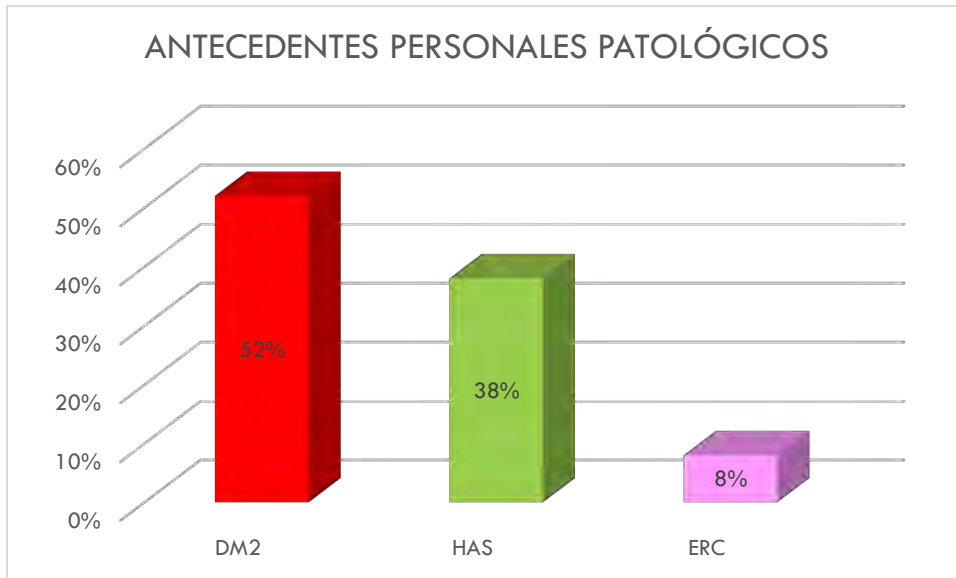
Gráfica 4. Antecedentes Heredo-familiares.



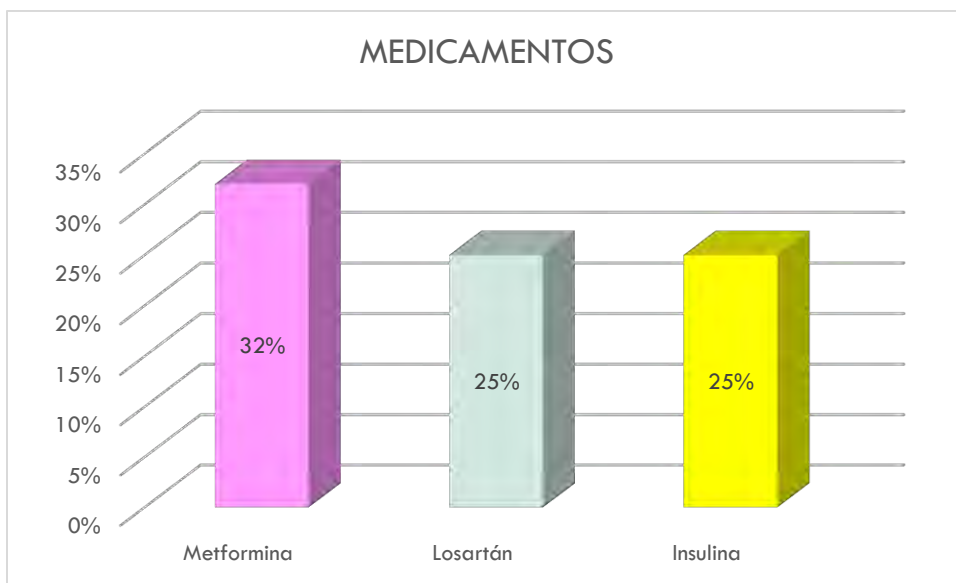
Gráfica 5. Antecedentes Personales No Patológicos.



Gráfica 6. Antecedentes oftalmológicos.



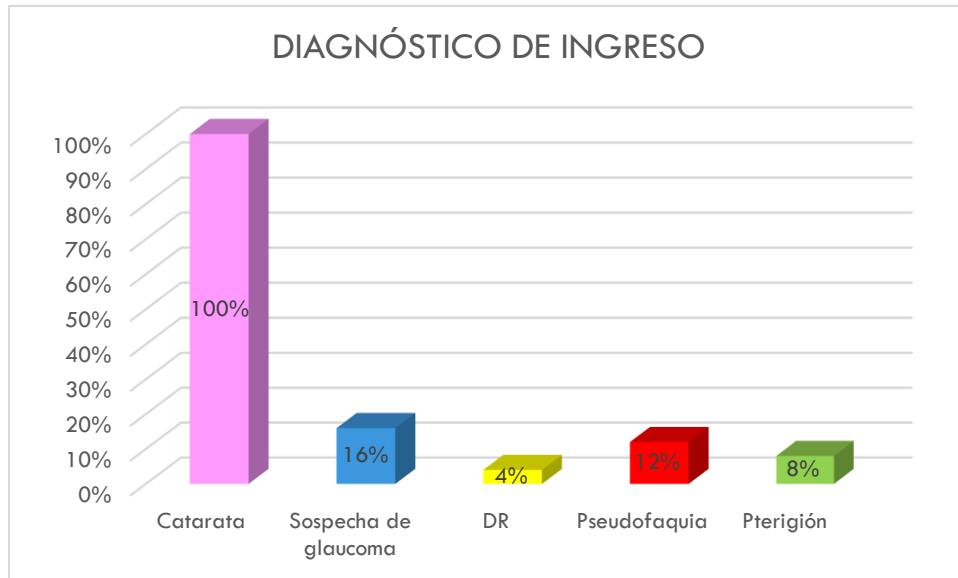
Gráfica 7. Antecedentes Personales Patológicos.



Gráfica 8. Medicamentos.

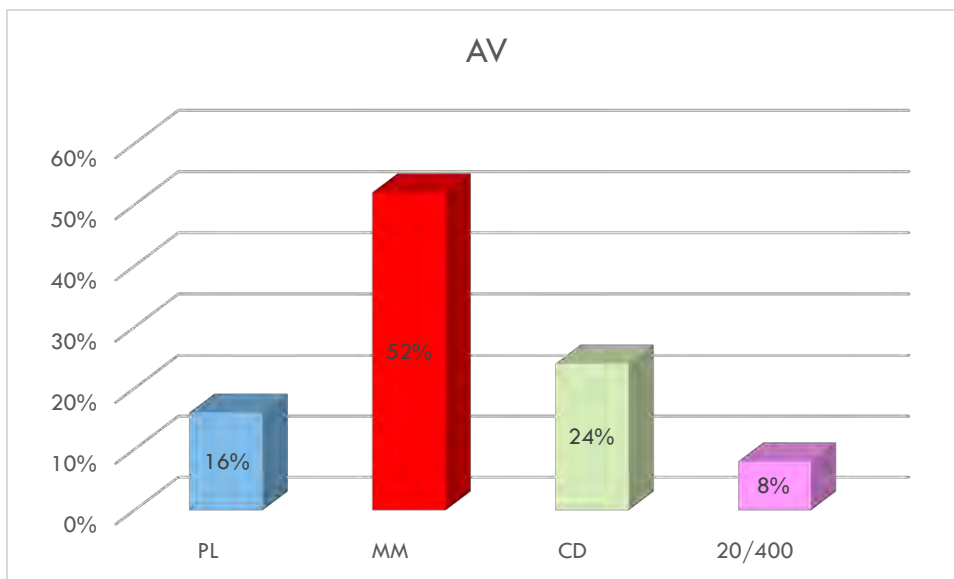
El diagnóstico principal de ingreso fue por baja visual en el 96% de los casos, con una mediana de 29 meses con éste síntoma con un intervalo intercuartilar ± 27 meses, dentro de un rango mínimo de 3 y máximo de 600 meses), cabe destacar que los hombres acudían más tempranamente, con una mediana de 26 meses (IQ ± 26 meses, 3-500 meses), comprado con las mujeres quienes acudían con una mediana de tiempo de 41 meses (IQ ± 38 meses, 12-600); en todos los casos, el diagnóstico de ingreso fue catarata, además

de otras patologías, tales como , sospecha de glaucoma en 4 casos (16%), pseudofaquia contralateral en 3 casos (12%), pterigión en 2 casos (8%), desprendimiento de retina en 1 caso (4%), al igual que pseudoexfoliación y neuritis óptica.



Gráfica 9. Diagnóstico de ingreso.

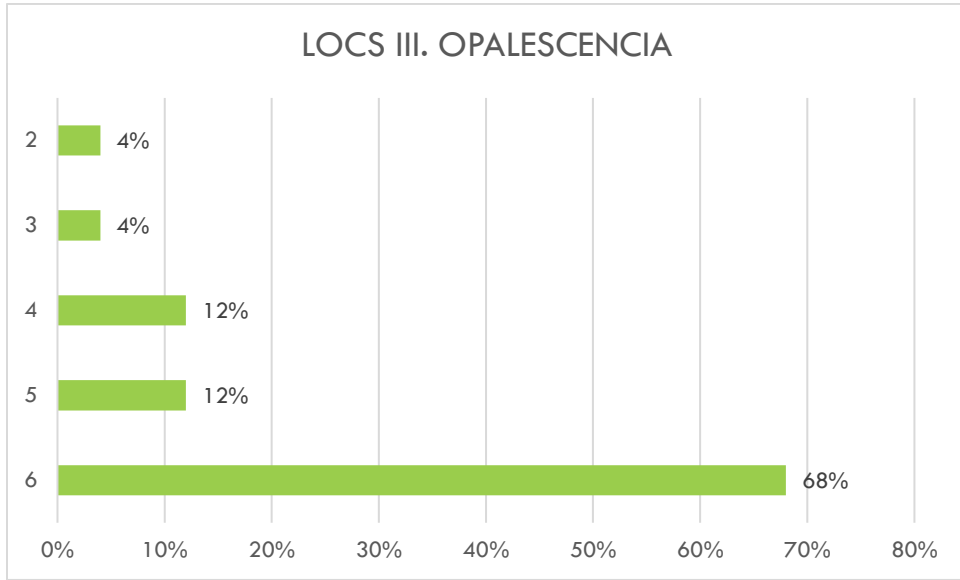
La medición de la agudeza visual previa, más frecuentemente reportada para el ojo operado fue movimiento de manos, en el 52% de los casos (13 ojos), seguida de cuenta dedos en el 24% de los casos (6 pacientes), percepción de luz en el 16% de los pacientes (4 casos) y 20/400 en el 8% de los casos (2 pacientes). La capacidad visual en toso estos casos no presentaba mejoría. La agudeza visual reportada en el ojo contralateral a operar iba del 20/30 al movimiento de manos. La agudeza visual reportada para ambos ojos, indistintamente de ser el ojo para la toma de cristalino o no, fue muy similar para ambos ojos, movimiento de manos, en el 36% para el ojo derecho, versus el 32% para el ojo izquierdo, la capacidad visual no presentó mejoría significativa para ambos ojos.



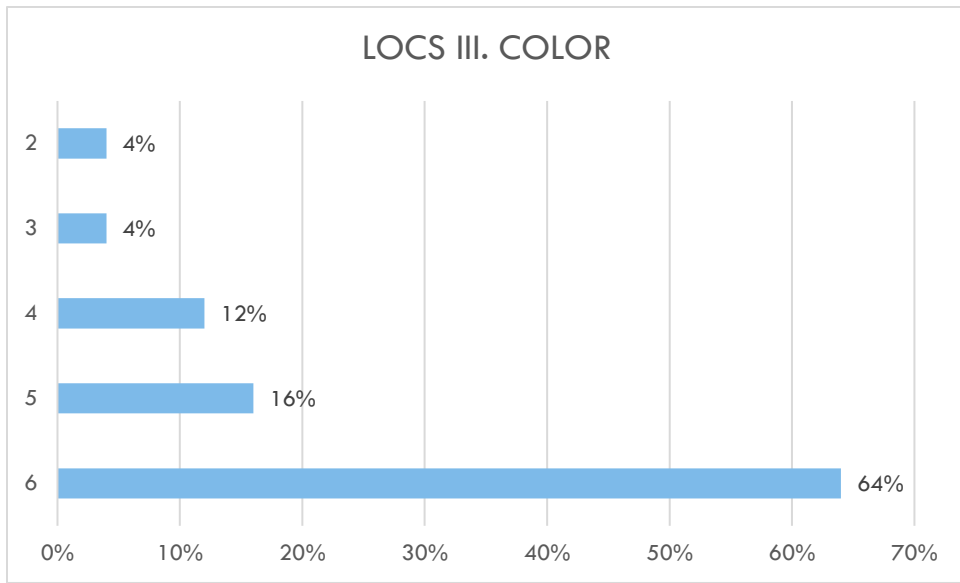
Gráfica 10. Agudeza Visual.

Para la valoración previa a la cirugía se realizaron diversas mediciones, además de la agudeza visual, se tomaron las queratometrías 1 y 2 para ambos ojos, encontrando una media de 44.60 DE \pm 1.15 para el ojo derecho, y una media de 44.30 DE \pm 1.16 para el ojo izquierdo. A la exploración mediante el uso de biomicroscopía con lámpara de hendidura, ningún paciente presentaba alteraciones en la película lagrimal, córnea cámara anterior, iris o pupila, si reportando alteración en la conjuntiva de 2 pacientes (8%) los cuales tenían en antecedente de resección de ptergión, la valoración del polo posterior fue difícil reportando mediante ultrasonido modo b, por la opacidad importante del cristalino, en casi todos los casos se reportó retina y coroides aplicadas, excepto en un paciente que presentaba desprendimiento de retina previo en ese ojo, previamente tratado con vitrectomía y endoláser.

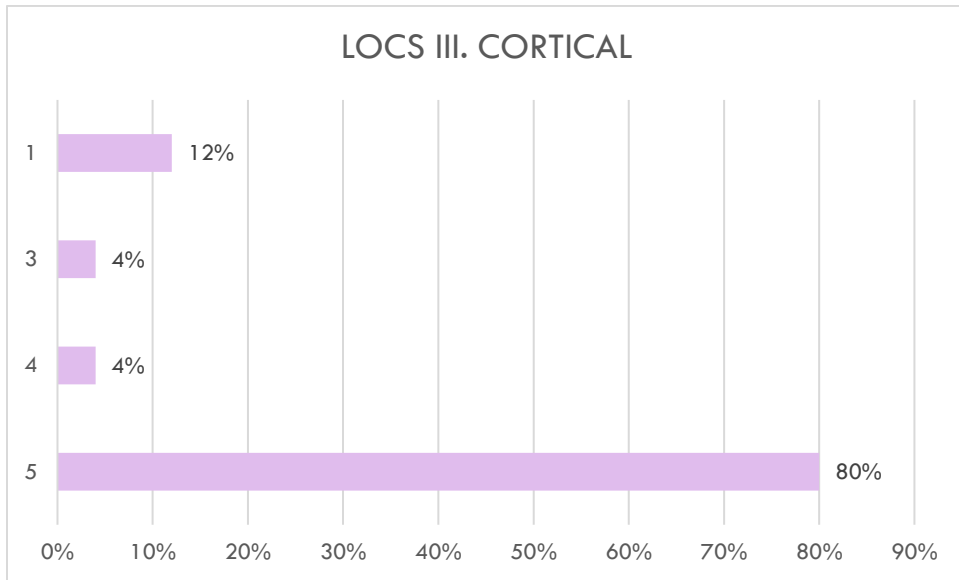
La clasificación de la opacidad del cristalino mediante el sistema de clasificación internacional LOCS III, se identificó con un grado de opalescencia de 6 en el 68% (17 cristalinos), 5 y 4 en 12% (3 cristalinos) respectivamente, y 3 y 2 en 4% (1 cristalino) respectivamente; con respecto al color en grado 6 en el 64% (16 cristalinos), 5 en 16% (4 cristalinos), 4 en 12% (3 cristalinos), y 2 y 3 en 4% de los casos (1 cristalino) cada uno ; el grado de cortical se reportó en 5 en el 80% de los casos (20 cristalinos), 4 y 3 en 4% (1 cristalino cada uno, y 1 en 12% (3 cristalinos); por último el grado de opacidad posterior se identificó en grado 5 en 84% (21 cristalinos), 3 en 4% (1 cristalino) y 1 en 12% (3 cristalinos).



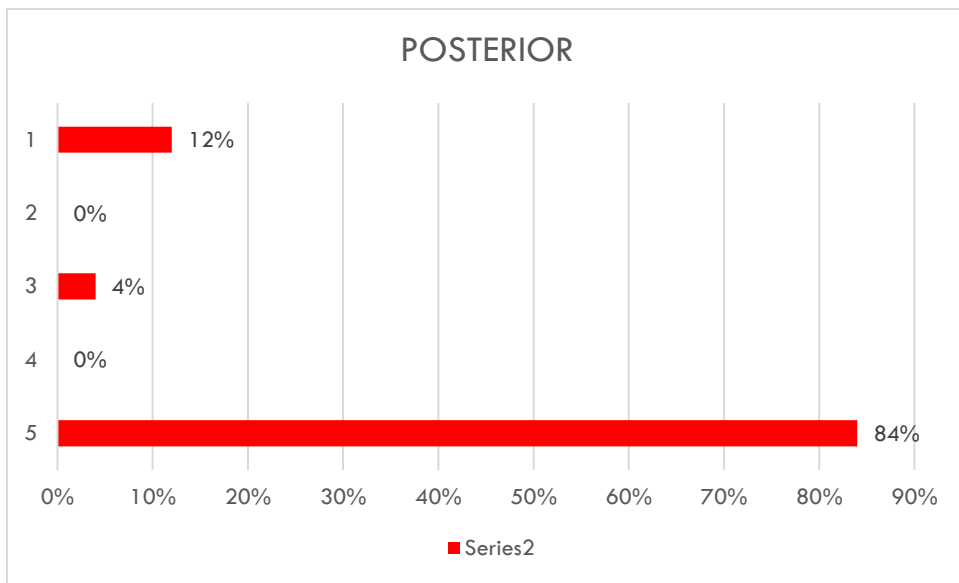
Gráfica 11. Grado de opalescencia LOCS III.



Gráfica 12. Grado de color LOCS III.



Gráfica 13. Grado de cortical LOCS III.



Gráfica 14. Grado de posterior LOCS III.

Se realizó ultrasonido modo A para valorar las características del segmento anterior, la media de la longitud axial se reportó en 23.48 mm DE±1.21, con un rango mínimo de 22 y máximo de 28 mm; la profundidad de la cámara anterior con una media de 3.38 mm DE±0.55 (2-5mm), el grosor del cristalino en una media de 3.53mm DE±0.65 (2-5mm).

También se realizó microscopía especular, observando una media de 2224 células $DE \pm 556$, con un mínimo de 1440 y máximo de 3346 células, con un coeficiente de variabilidad con una media de 32.09 $DE \pm 5.68$ (23-45).

Además se realizó un estudio de topografía corneal mediante cámara de Scheimplug utilizando el software Pentacam, en el cual se reportó principalmente la densidad del cristalino, obteniendo una media de 56.77 $DE \pm 26.94$ (27-100), con un promedio de las dos queratometrías 1 y 2 con una media de 534.57 $DE \pm 31.24$ (43-46), con paquimetrías medidas con la porción más delgada de la córnea con una media de 534.57 micras $DE \pm 31.24$ (493-574 micras); el volumen de la cámara anterior se observó con una media 224.71 mm^3 $DE \pm 132.49$ (101-510), la profundidad de la cámara anterior con una media de 2.88 mm $DE \pm 0.498$ (2-3), por último con un ángulo de la cámara anterior con una media de 3.54° $DE \pm 62.83^\circ$ (-90-50°).

Se solicitaron estudios preoperatorios de sangre, los importantes para éste estudio fueron reportados como: glucosa con una media de 118.12 mg/dl $DE \pm 28.40$ (70-166 mg/dl), urea con una mediana de 38.42 mg/dl $IQ \pm 12$ (24-220 mg/dl), nitrógeno ureico con mediana de 18 mg/dl $IQ \pm 6$ (11-103 mg/dl), cr/dl $DE \pm 1.88$ (4-11 mg/dl).

DISCUSIÓN

En nuestro país y en todo el mundo, la catarata sigue siendo la principal causa de ceguera reversible, a pesar de ellos, nos encontramos en un momento donde los recursos de la investigación se encuentran enfocados a mejorar las técnicas quirúrgicas, en algunos casos incrementando los costos, pero son pocos los estudios encaminados a tratar de entender y encontrar un método preventivo.

El conocimiento de la estructura y las interacciones de las cristalinas puede mejorar los métodos dirigidos a retardar la progresión de la agregación de proteínas y por lo tanto la dispersión de la luz en la formación de catarata. La modificación de proteínas y la agregación es el sello de envejecimiento del cristalino, y su control puede ser una clave para frenar dicho proceso.

El análisis proteómico nos brinda la posibilidad de conocer la estructura de las cristalinas, y así poder desarrollar nuevas técnicas para su reestructuración.

El reto actual, es poder encontrar la manera de revertir este proceso de envejecimiento en el cristalino, logrando así disminuir el número de ciegos por esta causa, éste es el primer estudio en nuestro país donde se pretende este objetivo, por lo que de obtener resultados favorables, sería la primera ocasión que se lograría, es un estudio ambicioso, a largo plazo, pero que resolvería, o por lo menos nos acercaría a resolver este problema de salud mundial.

CONCLUSIONES

Por ahora, podemos concluir que la recolección de la muestra mediante una red de frío es el método ideal para conservar las propiedades del cristalino y su posterior análisis.

Hasta el momento, von todo el análisis realizado de las variables independientes de los pacientes en el grupo control, no podemos concluir nada, se espera que estos hallazgos sean de importancia significativa al compararlos con el grupo control y al ampliar la muestras. Por lo que hasta este momento, no podemos atrevernos a llegar a conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thylefors B. A global initiative for the elimination of avoidable blindness. *Community Eye Health*. 1998;11(25):1-3.
2. Battle JF, Lansingh VC, Silva JC, Eckert KA, Resnikoff S. The cataract situation in Latin America: barriers to cataract surgery. *Am J Ophthalmol*. 2014 Aug;158(2):242-250.
3. Slingsby C, Wistow GJ. Functions of crystallins in and out of lens: roles in elongated and post-mitotic cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 2014 Jul;115(1):52-67.
4. Sharma KK, Santhoshkumar P. Lens aging: effects of crystallins. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1790(10):1095-108.
5. Takemoto L, Sorensen CM. Protein-protein interactions and lens transparency. *Exp Eye Res*. 2008 Dec;87(6):496-501.
6. Lampi KJ, Wilmarth PA, Murray MR, David LL. Lens β -crystallins: the role of deamidation and related modifications in aging and cataract. *Prog Biophys Mol Biol*. 2014 Jul;115(1):21-31.
7. Boelens WC. Cell biological roles of α B-crystallin. *Prog Biophys Mol Biol*. 2014 Jul;115(1):3-10.
8. Mainz A, Peschek J, Stavropoulou M, Back KC, Bardiaux B, Asami S, Prade E, Peters C, Weinkauff S, Buchner J, Reif B. The chaperone α B-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Nov;22(11):898-905.
9. Abdelkader H, Alany RG, Pierscionek B. Age-related cataract and drug therapy: opportunities and challenges for topical antioxidant delivery to the lens. *J Pharm Pharmacol*. 2015 Apr;67(4):537-50. Kannan R, Raju M, Sharma KK. The critical role of the central hydrophobic core(residues 71-77) of amyloid-forming α A66-80 peptide in α -crystallin aggregation: a systematic proline replacement study. *Amyloid*. 2014 Jun;21(2):103-9
10. Zhao L, Chen XJ, Zhu J, Zhang K, et.al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature*. 2015 Jul 30;523(7562):607-11.
11. Andley UP. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog Retin Eye Res*. 2007 Jan;26(1):78-98.
12. Hains PG, Truscott RJ. Age-dependent deamidation of lifelong proteins in the human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Jun;51(6):3107-14.
13. Hooi MY, Raftery MJ, Truscott RJ. Racemization of two proteins over our lifespan: deamidation of asparagine 76 in γ S crystallin is greater in cataract than in normal lenses across the age range. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Jun 14;53(7):3554-61.

14. Asomugha CO, Gupta R, Srivastava OP. Identification of crystallin modifications in the human lens cortex and nucleus using laser capture microdissection and CyDye labeling. *Mol Vis*. 2010 Mar 23;16:476-94.
15. Kim YH, Kapfer DM, Boekhorst J, Lubsen NH, Bächinger HP, Shearer TR, David LL, Feix JB, Lampi KJ. Deamidation, but not truncation, decreases the urea stability of a lens structural protein, betaB1-crystallin. *Biochemistry*. 2002 Nov 26;41(47):14076-84.
16. Ray NJ, Hall D, Carver JA. Deamidation of N76 in human γ S-crystallin promotes dimer formation. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jan;1860(1 Pt B):315-24.