



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE
REHABILITACIÓN
Luis Guillermo Ibarra Ibarra
ESPECIALIDAD EN:
OFTALMOLOGÍA

***“Análisis molecular de proteínas cristalinas; de
la clínico al diseño racional de fármacos para el
tratamiento de la enfermedad de Catarata.”***

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

OFTALMOLOGÍA

P R E S E N T A:

***Giovanna Yaret Montalvo
Domínguez***

PROFESOR TITULAR

Dra. Francisca Domínguez Dueñas

ASESOR

Dra. Francisca Domínguez Dueñas



Ciudad de México

Febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO, 2020

DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL
DIRECTORA DE EDUCACIÓN EN SALUD

DRA. XOCHIQETZAL HERNANDEZ LOPEZ
SUBDIRECTORA DE EDUCACION MEDICA

DR. ROGELIO SANDOVAL VEGA GIL
JEFE DEL SERVICIO DE EDUCACION MEDICA

DRA. FRANCISCA DOMINGUEZ DUEÑAS
PROFESOR TITULAR

ASESOR CLINICO Y METODOLOGICO

TÍTULO DEL PROYECTO

“Análisis molecular de proteínas cristalinas; de la clínico al diseño racional de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Catarata”

1. PARTICIPANTES

Investigador Responsable:

Nombre	Francisca Domínguez Dueñas
R.F.C	DODF780819
Cargo	Directora de Oftalmología
Servicio de adscripción	Oftalmología
División a la cual pertenece	Oftalmología
Extensiones telefónicas	18175
Dirección electrónica	fran_dd@yhao.com
Grado máximo de estudios	Maestría en ciencias médicas
Disciplina	Oftalmología
Especialidad	Oftalmología
Pertenece al Sistema Interinstitucional de Investigación	No
Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores	Sí

Nombre	Giovanna Yaret Montalvo Domínguez
R.F.C	MODG911005MDFNMV
Cargo	Residente 3er año Oftalmología
Servicio de adscripción	Oftalmología
División a la cual pertenece	Oftalmología
Extensiones telefónicas	18131
Dirección electrónica	yaretmontalvo@gmail.com
Grado máximo de estudios	Médico cirujano
Disciplina	Oftalmología
Especialidad	Oftalmología

Pertenece al Sistema Interinstitucional de Investigación	No
Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores	No

Nombre	Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda
División a la cual pertenece	Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)
Dirección electrónica	
Grado máximo de estudios	
Disciplina	

Nombre	Dr. Fanis Missirlis
División a la cual pertenece	CINVESTAV Investigador del Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias
Dirección electrónica	
Grado máximo de estudios	
Disciplina	

Nombre	Dra. Laura Domínguez
División a la cual pertenece	Facultad de Química, UNAM
Dirección electrónica	
Grado máximo de estudios	
Disciplina	Química

Nombre	Dra. Liliana Quintanar
División a la cual pertenece	Departamento de Química del Cinvestav
Dirección electrónica	
Grado máximo de estudios	

Disciplina	
------------	--

2. DURACIÓN APROXIMADA DEL PROYECTO

Inicio

Mes Año

Término

Mes Año

3. TABLA DE CONTENIDO:

1	Título del proyecto	Página 1
2	Participantes	Página 3
3	Duración aproximada del proyecto	Página 5
4	Tabla de contenido	Página 6
5	Introducción	Página 7
6	Marco teórico	Página 8
7	Justificación	Página 10
8	Planteamiento del problema	Página 12
9	Pregunta de investigación	Página 15
10	Hipótesis	Página 15
11	Objetivos	Página 15
12	Metodología	Página 16
12.1	Diseño del estudio	Página 17
12.2	Universo de trabajo	Página 17
12.3	Criterios de inclusión	Página 18
12.4	Criterios de eliminación	Página 18
12.5	Criterios de exclusión	Página 19
12.6	Tamaño de la muestra	Página 19
12.7	Metodología y descripción de procedimientos	Página 19
12.8	VARIABLES del estudio	Página 21
12.9	Análisis estadístico propuesto	Página 21
13	Aspectos éticos	Página 25
14	Infraestructura disponible	Página 25
15	Resultados	Página 26
16	Discusión.	Página 27
17	Bibliografía.	Página 27
18	Anexos.	Página 27

Análisis Molecular de Proteínas Cristalinas; de la clínica al diseño racional de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de catarata.

I. Introducción.

La enfermedad de catarata consiste en la opacidad del cristalino del ojo y es la principal causa de ceguera en el mundo, siendo responsable del 40 al 80% de los 45 millones de casos de ceguera a nivel mundial (1). Las cristalinas son las proteínas más abundantes en el lente cristalino, comprenden más del 90% de las proteínas totales y son responsables de mantener la transparencia del lente. Las cataratas se forman cuando las proteínas del lente cristalino forman agregados (complejos de alto peso molecular) que obstruyen el paso de luz porque pierden su transparencia (3). Las cristalinas se clasifican como alfa-cristalinas (AC), beta-cristalinas (BC) y gamma-cristalinas (GC), siendo las AC las más abundantes en el lente humano(7). Las AC son miembros de la familia de proteínas pequeñas de choque térmico (sHsp) y funcionan como chaperonas moleculares que previenen la agregación de proteínas desnaturalizadas. Aunque la protección contra el desarrollo de cataratas depende de tener una AC chaperona funcional, los eventos iniciales están frecuentemente asociados a daños estructurales en las BC y GC, los cuales no han sido bien caracterizados.

El objetivo de este estudio es identificar las modificaciones químicas que sufren las beta-cristalinas (BC) y gamma-cristalinas (GC) en el lente con catarata utilizando métodos proteómicos y teóricos, y correlacionar las modificaciones bioquímicas de las cristalinas observadas en el lente con catarata con la historia clínica del paciente, con el tipo y grado de avance de la catarata, y con los niveles de metales encontrados.

Se incluirán muestras de cristalino con catarata de pacientes a los que se les realice cirugía, los cuales serán enviados para su análisis a la unidad de proteómica del INMEGEN y a laboratorio de bioquímica del CINVESTAV.

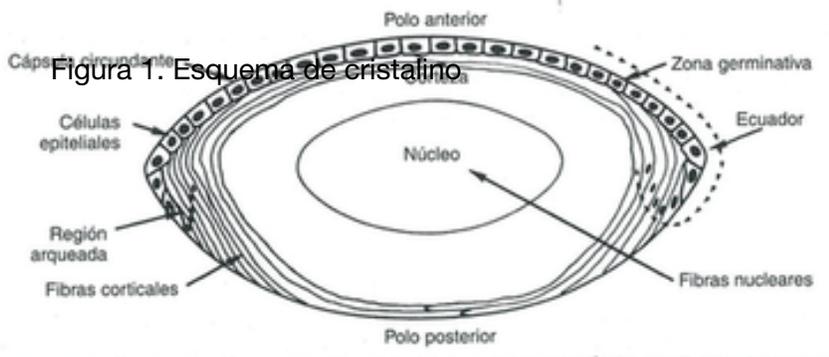
Se conformó para este proyecto, un equipo multidisciplinario para el estudio del lente con catarata que incluye expertos en el área clínica-quirúrgica así como expertos en el área de proteómica y bioquímica de proteínas. Elucidar el mecanismo molecular de agregación de las cristalinas sentará las bases para el desarrollo de terapias que permitan prevenir o retrasar el desarrollo de cataratas.

2.- MARCO TEÓRICO

La enfermedad de catarata consiste en la opacidad del cristalino del ojo y es la principal causa de ceguera reversible en el mundo, siendo responsable del 40 al 80% de los 45 millones de casos de ceguera a nivel mundial (1). En México, el 10.6 % de la población mayor de 50 años vive con catarata, y el 1.6% es ciega por esta enfermedad (2). La etiología de catarata está fuertemente asociada al envejecimiento, y su prevalencia aumenta drásticamente para la población mayor de 50 años (3). Sin embargo, otros factores de riesgo para el desarrollo de catarata incluyen la diabetes, la exposición crónica a metales y a radiación UV. (4, 5, 6).

El cristalino, única estructura derivada del ectodermo superficial, posee el segundo poder dióptrico más importante del sistema óptico, permite enfocar objetos a diferentes distancias mediante un aumento o disminución funcional de su curvatura, y está formado por una muy alta concentración de proteínas que le confieren un índice de refracción elevado y la capacidad para enfocar los rayos de luz en la retina. Las cataratas se forman cuando las proteínas del lente cristalino forman agregados (complejos de alto peso molecular) que obstruyen el paso de luz porque pierden su transparencia (3).

Las cristalinas son las proteínas más abundantes en el lente cristalino, comprenden más del 90% de las proteínas totales y son responsables de mantener la transparencia



del lente. Para asegurar la transparencia del lente, el cristalino está compuesto por células diferenciadas que carecen de organelos, tienen un metabolismo muy bajo y han perdido la capacidad de sintetizar

nuevas proteínas o degradar proteínas dañadas (3). Este entorno bioquímico impone las condiciones de alta estabilidad y solubilidad para las proteínas del lente. Por tanto, las proteínas del cristalino son las proteínas más estables en el cuerpo humano.

Las cristalinas se clasifican como alfa-cristalinas (AC), beta-cristalinas (BC) y gamma-cristalinas (GC), siendo las AC las más abundantes en el lente humano(7). Las AC son miembros de la familia de proteínas pequeñas de choque térmico (sHsp) y funcionan como chaperonas moleculares que previenen la agregación de proteínas desnaturalizadas. En humanos, las AC están codificadas en dos genes: el de alfaA-cristalina que se expresa principalmente en el lente, y el de la alfaB-cristalina que también se expresa en otros tejidos como músculo, cerebro y corazón (7). Las BC son proteínas diméricas que son clasificadas en BC ácidas y básicas. Los mamíferos tienen siete subclases de BC: tres de ellas con carácter básico (B1, B2, B3) y cuatro con carácter ácido (A1, A2, A3, A4). La abundancia relativa de las diferentes subclases de BC varía entre las diferentes especies, y el humano casi no tiene BCs del tipo A2 y B3 (7). Por otro lado, las GC se dividen en gammaM, gammaN, gammaS y gammaA-F. Los subgrupos S y N son expresadas en todos los vertebrados, el subgrupo M es expresado en vertebrados acuáticos, mientras que el subgrupo A-F es limitado a mamíferos. Las tres GC más abundantes en el lente humano son las gammaD- y gammaC- cristalinas que abundan en el núcleo del lente, y la gammaS- que es más abundante en la corteza del lente (7). Varias cristalinas humanas han sido caracterizadas estructuralmente. Se cuenta con estructuras elucidadas por difracción de rayos X de las BC B2 y B3, así como de la gammaD cristalina (810); mientras que las gammaC y

gammaS humanas han sido estudiadas por resonancia magnética nuclear (11, 12). Tanto las GC como las BC deben su estabilidad al arreglo de hojas beta antiparalelas que forman cuatro motivos estructurales de tipo llave griega, como se observa en la Figura 2. Cabe mencionar que la caracterización estructural de las alfa-cristalinas se ha visto limitada por el hecho de que se trata de proteínas que forman estructuras oligoméricas. En el lente humano, las AC unen a las BC y GC, formando complejos estables que previenen su auto-agregación.

La catarata es una causa importante de morbilidad en nuestro medio como se comentaba previamente y debido a su importancia surge la necesidad de unificar conceptos. Actualmente existen diversas clasificaciones que en la práctica clínica facilitan la unificación de los conceptos clínicos. El sistema de Clasificación de opacidad de cristalino, entre ellas destacan el sistema Oxford, LOCS II, LOCS III.

Clasificación de LOCS III

El sistema de Clasificación de opacidad de cristalino, por sus siglas en inglés LOCS en su última versión III es un sistema estandarizado para clasificar los cristalinos de acuerdo a su aspecto clínico bajo biomicroscopia.

Fue introducida en 1989 y posteriormente fue validada por otros investigadores en 1990. Contiene un set de fotografía estandarizadas elegidas del Estudio Longitudinal de Catarata e del Centro de Investigación clínica de Boston, los parámetros evaluados son opalescencia nuclear (NO), coloración nuclear (NC) basándose en 6 imágenes tomadas en lámpara de hendidura, y para la opacidad cortical (C) y subcapsular posterior (P) otras 5 imágenes mediante transiluminación. Se gradúan en escala decimal y esta puede ir de 0.1 como puntaje máximo y hasta 6.9 en la opalescencia y coloración del núcleo y hasta 5.9 en opacidad cortical y subcapsular posterior. (13)

Ha sido utilizada en diferentes estudios epidemiológicos para el estudio de catarata relacionada con la edad avanzada. Su objetivo es correlacionar la opacidad de cristalino con la afección visual que produce al paciente.

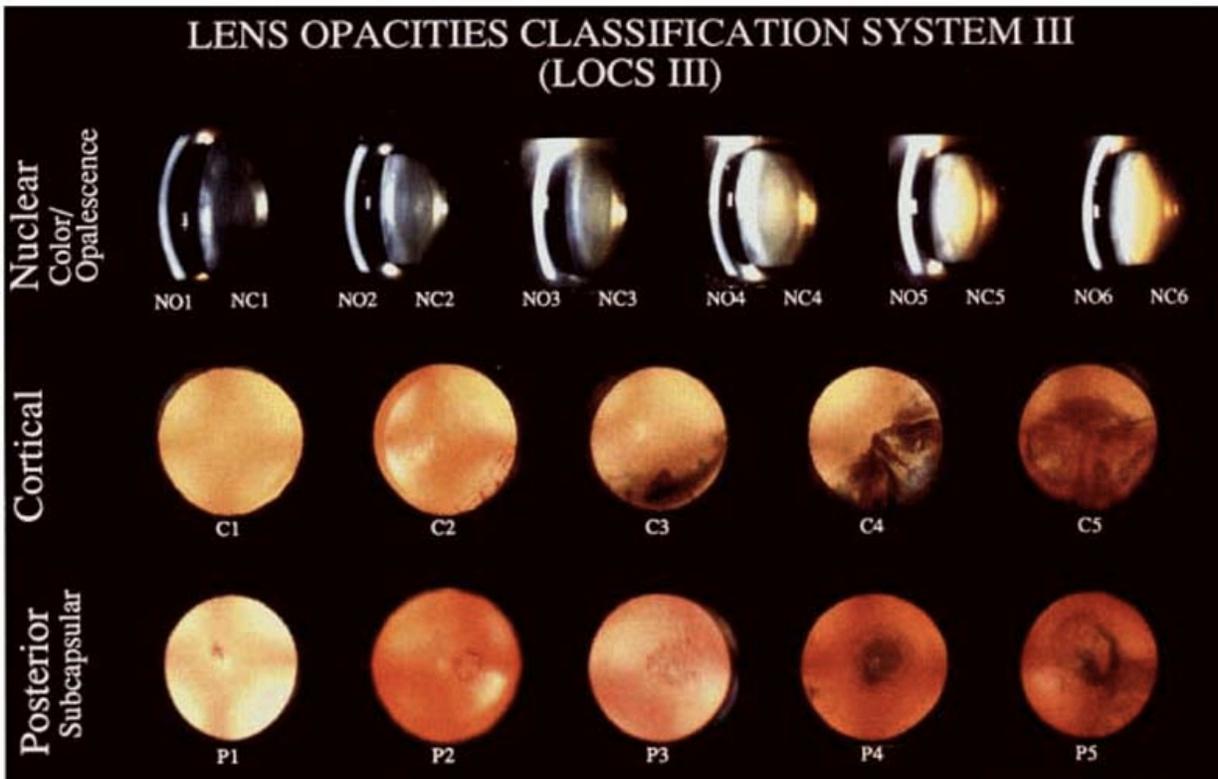


FIGURA . SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE OPACIDAD DE CRISTALINO III. Describe el set de fotografías para clasificar los 4 parámetros; opalescencia y coloración nuclear, opacidad cortical, opacidad subcapsular posterior.

Su practicidad y su reproducibilidad en la práctica clínica permite una valoración interobservador más similar.

3.- DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento de las Enfermedades Visuales ha determinado que la catarata es la primera causa de ceguera en México. De hecho, el 67% de los casos de ceguera en personas mayores de 50 años se deben a la enfermedad de catarata (1). La ceguera por catarata impone un costo económico muy importante. Un estudio realizado por Deloitte Access Economics (DAE) en 2013 estimó que el costo económico anual para México que resulta de enfermedades visuales es de 9274 millones de pesos mexicanos, de los cuales el 39% está relacionado con la enfermedad de catarata (2). Este cálculo incluye costos directos en el sistema de salud, pérdidas por productividad laboral y costos indirectos de cuidados del paciente. El costo económico anual para México por la enfermedad de catarata asciende a los 3636 millones de pesos.

Existen distintas etiologías en la formación de catarata, siendo el envejecimiento la más importante. Además, entre el 10 y el 25 % de la población mexicana mayor de 40 años vive con diabetes, cuya consecuencia más común es la afectación ocular por retinopatía y catarata. A medida que la incidencia de diabetes y la expectativa de vida aumentan en nuestro país, el número de casos de catarata también se incrementará, a la par con el costo económico mencionado. A pesar de ser curable mediante cirugía, en México únicamente la quinta parte de las personas afectadas por esta enfermedad recibe tratamiento quirúrgico debido al pobre acceso a los servicios de salud. En consecuencia, sectores importantes de la población mexicana son víctima de un tipo de ceguera evitable. La gravedad de la situación es tal que, en su sesión del 26 de noviembre de 2016, el Senado de la República Mexicana aprobó un punto de acuerdo en el que exhortan al titular de la Secretaría de Salud a promover campañas y estrategias para la prevención y detección de discapacidad visual, específicamente por cataratas.

4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuales son los cambios estructurales en las cristalinas que inducen su agregación e intervienen en la formación de catarata?

5. -ANTECEDENTES

La protección contra el desarrollo de cataratas depende de tener una AC chaperona funcional, los eventos iniciales están frecuentemente asociados a daños estructurales en las BC y GC. De hecho, en lentes con catarata se han identificado las siguientes modificaciones bioquímicas de cristalinas:

- a) Desamidación de glutaminas y asparaginas
- b) Oxidación de triptofano a kinurenina
- c) Oxidación de cisteínas y metioninas
- d) Glicación de lisinas, y fragmentación de proteínas.

La desamidación es una modificación muy común en las proteínas y se ha observado que es la modificación postraducciona l más importante en las BC de los cristalinos

envejecidos, particularmente las A3 y B1. Por otro lado, la oxidación de triptofano ha sido observada tanto en las BC A3 y B1, como en las gammaS- y gammaD cristalinas (13). En la Figura 3, se muestran ejemplos de las desamidaciones de glutaminas y asparaginas y oxidación de triptófanos reportadas para la betaA4 y gamma D cristalinas. Algunas de estas modificaciones, como la desamidación, son ocasionadas por procesos normales de envejecimiento (14), mientras que otras pueden estar asociadas a condiciones específicas del paciente, como: exposición excesiva a radiación UV, exposición ocupacional o ambiental a metales, cambios bioquímicos asociados a la enfermedad de diabetes, tabaquismo, entre otras. Aunque se sabe que algunas de estas condiciones son factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de cataratas, aún no se entienden las bases moleculares implicadas. Estudios recientes han demostrado que la exposición in vitro de la gamma-D cristalina a radiación UV causa oxidación de triptófanos, tirosinas y cisteínas, ocasionando pérdida de estabilidad y plegamiento de la proteína. Por otro lado, se ha mostrado que metales como cobre y zinc pueden inducir pérdida de plegamiento y estabilidad estructural, causando la agregación no amiloide de la gammaD-cristalina. Aún no se sabe si estas observaciones en el tubo de ensayo correlacionan con las modificaciones químicas de las cristalinas observadas en el lente con cataratas.

La identificación de dicha correlación se ve limitada por el hecho de que son pocos los estudios proteómicos de lentes con catarata que han intentado correlacionar las modificaciones bioquímicas de las cristalinas con el tipo de catarata formado, su grado de avance, y la historia clínica del paciente que pudiera revelar correlaciones con condiciones específicas como: exposición crónica a metales y radiación UV, diabetes, tabaquismo, entre otras. Aunque las cristalinas son proteínas muy estables, sus modificaciones químicas pueden causar pérdida de estabilidad, promoviendo la formación de intermediarios parcialmente desplegados, en los que algunas regiones hidrofóbicas se ven expuestas al solvente. De hecho, las diferentes mutaciones asociadas a catarata congénita inducen cambios estructurales importantes en las cristalinas implicadas; por ejemplo, la mutación W42R introduce un residuo polar en una región hidrofóbica del dominio N-terminal de la gammaD-cristalina, dando lugar a

una pérdida de estabilidad estructural, pérdida parcial de plegamiento, y propensión a agregarse. Los intermediarios parcialmente desplegados son generalmente estructuras poco estables con alta propensión a la agregación no amiloide. La figura 4 muestra el mecanismo propuesto para la agregación no amiloide de las cristalinas, el cual involucra la formación de intermediarios parcialmente desplegados con regiones hidrofóbicas expuestas al solvente, que dan lugar a la formación de especies de alto peso molecular por el mecanismo de "domain swapping" (3). En el lente humano la AC reconoce dichas regiones hidrofóbicas y une a las BC y GC parcialmente desplegadas, formando complejos estables que previenen su agregación (3, 21). Dado que las chaperonas AC no son capaces de corregir el plegamiento de sus sustratos; con la edad, una fracción importante de la chaperona termina acomplejada con las BC y GC modificadas.

La incapacidad del lente para mantener solubles a las cristalinas dañadas resulta en la acumulación y agregación de proteínas, y por tanto al desarrollo de la catarata. Dado que la caracterización estructural de las alfa-cristalinas se ha visto limitada por su naturaleza oligomérica, no está muy claro cómo las AC identifican a los intermediarios parcialmente desplegados que son precursores de la agregación no amiloide. Se han identificado las regiones en las secuencias de las AC humanas que son clave para este reconocimiento molecular; a estas regiones se les ha denominado mini-cristalinas y son sorprendentemente pequeñas (de 10 a 15 aminoácidos). Por ejemplo, la región 71-88 de la alfaA-cristalina humana, con secuencia KVFIFLDVKHFSPEDLTVK, ha sido identificada como el sitio de actividad chaperona. De hecho, el péptido reproduce el efecto inhibitorio de la proteína completa en la agregación de proteínas desnaturalizadas, y su secuencia está altamente conservada en la familia de las sHSPs. Esto demuestra que es posible mimetizar la acción de las chaperonas AC con moléculas pequeñas como péptidos. Lo que se requiere es tener una mejor comprensión de la estructura de los intermediarios parcialmente plegados que se forman cuando las cristalinas sufren las modificaciones químicas arriba mencionadas. Los estudios estructurales de intermediarios parcialmente plegados se ven impedidos por su baja estabilidad y propensión a agregarse. Por tanto, el uso de herramientas

teóricas para elucidar las estructuras y conformaciones de las cristalinas que han sufrido modificaciones químicas puede ser una buena estrategia para el diseño racional de moléculas con la actividad chaperona que puedan prevenir la agregación de las cristalinas. No obstante, son pocos los estudios teóricos realizados hasta el momento sobre estas proteínas.

6.- JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la estructura y las interacciones de las cristalinas puede brindar una intervención directa sobre la progresión de la agregación de proteínas y por lo tanto en la formación de catarata.

Las cataratas se forman cuando las proteínas del lente cristalino forman agregados (complejos de alto peso molecular) que obstruyen el paso de luz. Elucidar el mecanismo molecular de agregación de las cristalinas sentará las bases para el desarrollo de terapias que permitan prevenir o retrasar el desarrollo y progreso de cataratas. En este proyecto proponemos un estudio que abarca desde la caracterización bioquímica de lentes con catarata obtenidos en la clínica para elucidar las modificaciones que sufren las cristalinas en los diferentes estadios de la enfermedad, hasta el estudio experimental y teórico del impacto de dichas modificaciones, para en un futuro facilitar el diseño racional por métodos computacionales de moléculas con potencial terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de cataratas.

7.- HIPÓTESIS

No hay hipótesis de estudio, debido a que se trata de un estudio descriptivo

7.- OBJETIVO GENERAL

Identificar las modificaciones químicas que sufren las beta-cristalinas (BC) y gamma-cristalinas (GC) en el lente con catarata

8.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las características clínicas y por densitometría del cristalino con catarata de los pacientes candidatos a cirugía de catarata
- Utilizar métodos proteómicos para caracterizar los cambios estructurales de las cristalinas en lentes obtenidos de pacientes candidatos a cirugía de catarata.
- Correlacionar las modificaciones bioquímicas de las cristalinas observadas en el lente con catarata con la historia clínica del paciente, con el tipo y grado de avance de la catarata, y con los niveles de metales encontrados.
- Determinar niveles de metales de transición y metales pesados.

9.- MATERIAL Y MÉTODOS

9.1.- Es un método observacional, descriptivo, transversal.

9.2.- Descripción del universo de trabajo.

Cristalinos con catarata obtenidos de pacientes que son operados de catarata.

9.4.- Criterios de inclusión:

- Edad: mayores de 40 años
- Sexo indistinto
- Disminución de la capacidad visual clínicamente significativa menor de 20/40
- Con diagnóstico clínico de catarata senil en uno o ambos ojos

9.5.- Criterios de eliminación:

- Pacientes en los que en el evento quirúrgico no pueda tomarse la muestra de catarata

9.6.-Criterios de exclusión:

- Cirugías oculares previas o tratamientos con láser
- Alguna otra patología ocular asociada a catarata.

9.7.- Tamaño de muestra

- 70 cristalinos con catarata

9.8.- Descripción de las variables clínicas de estudio, unidades de medida y escalas de medición.

Variable	Definición.	Tipo de variable	Escala de medición
Edad	Años Cumplidos de vida al momento de entrar al estudio.	Cuantitativa continua	Años
Género	Condición orgánica que distingue al hombre de la mujer.	Dicotómico	Masculino Femenino
Antecedentes personales patológicos	Enfermedades sistémicas que padece el paciente	Categórica	Enfermedad
Capacidad Visual	Agudeza visual con corrección óptica. Límite espacial de discriminación visual.	Cuantitativa continua	Log Mar
Refracción	Valor dióptrico del punto remoto, expresado con signo contrario.	Cuantitativa continua	Equivalente esférico. D i o p t r í a s p o s i t i v a s o n e g a t i v a s.
Presión intraocular	Fuerza ejercida por el humor acuoso y vítreo sobre la superficie del ojo.	Cuantitativa continua	mmHg
Paquimetría corneal	Grosor de la córnea central.	Cuantitativa continua	Micras
Tipo de Catarata	Clasificación de la catarata	Ordinal	LOCS III
Densitometria del cristalino	Medición de la densidad del cristalino por interferometría con Pentacam	Cuantitativa continua	
Fondo de OJO	Hallazgos en el polo posterior del paciente	Categórica	Normal Anormal No valorable
Patologías oculares	E n f e r m e d a d e s oftalmológicas del paciente	Categórica	Enfermedad

9.9.- Análisis estadístico

Se utilizará estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión para resumir variables clínicas de los pacientes y de la estadificación de la catarata según la clasificación de LOCS.

Se utilizará de la misma forma, estadística descriptiva para resumir las características moleculares de las proteínas con el análisis proteómico.

10. Descripción de procedimientos que se llevará a cabo en el Instituto Nacional de Rehabilitación en servicio de Oftalmología.

La cirugía de catarata se realizará por la técnica de extracción extracapsular de catarata por médico residente u oftalmólogo titulado y se recolectó la muestra de cristalino en jeringa de 3 o 5 ml.

Todos los pacientes fueron valorados en una revisión inicial, que incluía anamnesis completa, toma de agudeza visual, toma de refracción con autorefractor, biomicroscopia con lampara de hendidura, toma de microscopio especular, topografía corneal (realizado con PENTACAM), calculo de lente intraocular (ecografía modo A o por interferometria IOL 500), así como toma de fotografías clínicas.

serán sujetos a una revisión oftalmológica completa, incluyendo agudeza visual, biomicroscopia y oftalmoscopia posterior. Se integrará la historia clínica de cada paciente incluyendo: edad, sexo, antecedentes patológicos, oftalmológicos, heredo-familiares, condiciones ambientales y laborales, uso de medicación tópica o sistémica, medición de densidad del núcleo del cristalino, presión ocular y arterial, y análisis preoperatorios de sangre y orina. Los lentes extraídos serán divididos en dos partes y almacenados a -80C para su posterior análisis.

Se realizará una historia clínica y revisión oftalmológica completa.

1) HISTORIA CLÍNICA.

- a) Ficha de identificación: Se tomaran 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 autorrefractómetro.
- 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). La clasificación que utilizamos es LOCS III.
- 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.

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.

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

5) Recolección de muestra. Posterior a la extracción del cristalino se colocaron en jeringa estéril de 5 ml adecuadamente cerrada para evitar la desecación de la muestra, rotulando los datos del paciente (nombre, registro, día y cirugía realizada). Una vez terminada la cirugía y bajo condiciones estériles se partía cristalino con hoja de bisturí justo por la mitad, colocando cada tanto en alicuotas también membreteadas con los datos del participante. Se mantenían bajo refrigeración hasta que fueran recolectadas por CINVESTAV y el INMEGEN.

11.- ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

11.1.- Programa de trabajo: cronograma, metas, etapas de la investigación.

	Agosto 2018	Septiembre 2018 - Febrero 2019	Octubre 2018 - Mayo 2019	Junio - Julio 2019	Agosto- Octubre 2019	Noviembre -Diciembre 2019
Organización del grupo de trabajo	X					

Estudio clínico y reclutamiento de pacientes candidatos a cirugía		X				
Toma de muestras de catarata durante la cirugía						
Análisis molecular proteómico de cristalinos				X		
Medición de iones metálicos en cristalinos			X			
Análisis de resultados					X	
Redacción de artículos para publicación						x

12. Resultados

En nuestro estudio se incluyeron 70 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión. Participaron un total de 35 mujeres (56%) y 27 hombres (44%) (Figura 3). Con edades entre 50 y 94 años de edad, con una media de 68.9 años. Todos cumplieron con los criterios de inclusión y firmaron consentimiento informado. Se evaluaron 34 ojos derechos y 36 ojos izquierdos (Figura 4). En nuestra muestra, 39 de los pacientes contaba con antecedente de Diabetes Mellitus tipo 2, 29 pacientes con antecedente de Hipertensión Arterial Sistémica y 7 pacientes con antecedentes de toxicomanía.

13.- Discusión.

La catarata puede presentarse bajo diferentes circunstancias, pero como ya se ha descrito la forma senil es la más frecuente, algunas de los factores que pueden precipitar su aparición es la presencia de diferentes comorbilidades como diabetes Mellitus tipo 2 y otras enfermedades sistemas, así como la toma de diferentes medicamentos como esteroides o medicamentos utilizados en quimioterapia. quemaduras eléctricas, etcétera. De acuerdo a los resultados encontramos que existía una precipitación Estos resultados son controversiales ya que no se cuenta con

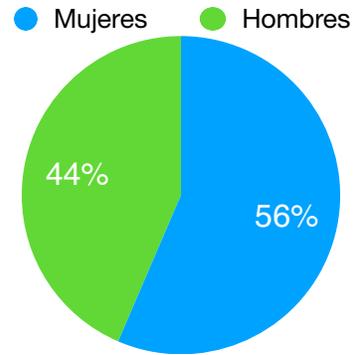


Figura 3. Prevalencia de acuerdo al género

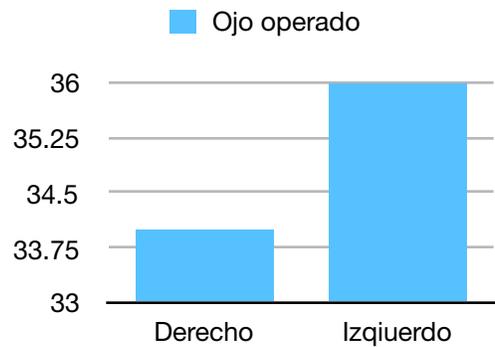
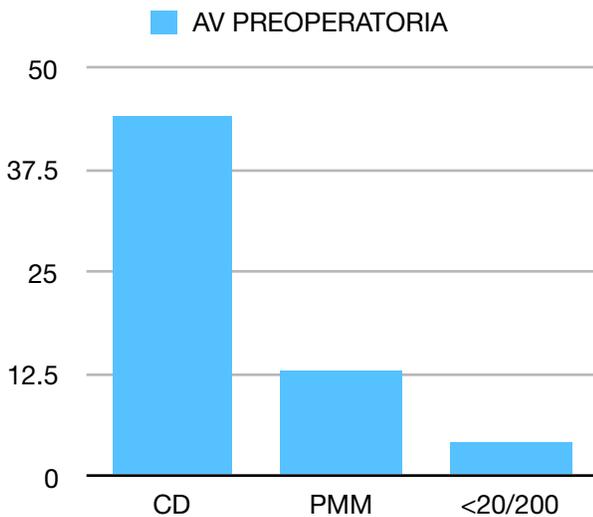


Figura 4. Ojo operado

14.-Conclusiones.

El resultado de los cambios bioquímicos y proteómicos refleja que existe un metabolismo acelerado por parte de las proteínas cristalinas que produce la desnaturalización proteica temprana, principalmente de las beta cristalinas y por lo tanto una disminución de las funciones que estas producen. Lo que cobra especial relevancia, ya que como se ha comentado previamente son encargadas del estricto control hidroelectrolítico del cristalino.

La catarata es una enfermedad sumamente prevalente en nuestro medio, entre las principales

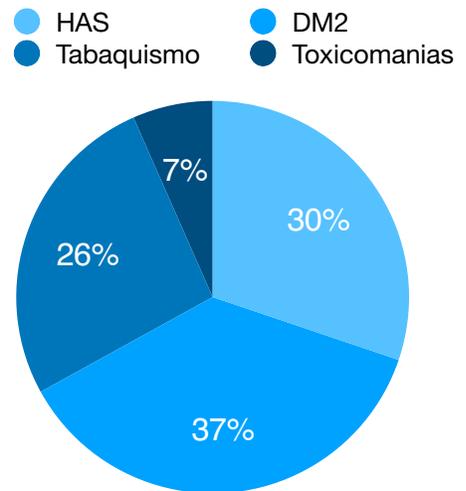


Figura 5. Antecedentes de importancia de pecientes. HAS: hipertensión arterial sistémica, Dm:

causas, debido a que la expectativa de vida ha aumentado considerablemente y debido al aumento tan importante de prevalencia de enfermedades cronicodegenerativas

A pesar de conocer algunos de estos cambios en las proteínas, aún existe una brecha importante sobre el conocimiento que debemos tener para desarrollar técnicas farmacológicas para detener o revertir la enfermedad de catarata.

13.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (de acuerdo a las Normas de Vancouver)

- [1] Batlle, J. F., Lansingh, V. C., Silva, J. C., Eckert, K. A., et al. (2014) The cataract situation in Latin America: Barriers to cataract surgery, *Am J Ophthalmol* 158, 242-250.
- [2] Economics, D. A. (2014) The economic cost and burden of eye diseases and preventable blindness in Mexico.
- [3] Moreau, K. L., and King, J. A. (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention, *Trends in Mol Med* 18, 273-282.
- [4] Pollreisz, A., and Schmidt-Erfurth, U. (2010) Diabetic cataract - Pathogenesis, Epidemiology and Treatment, *J Ophthalmol* 2010, Article ID 608751.
- [5] Donald, H. (1962) In *The diseases of occupations* 3rd ed., Little, Brown and Co.
- [6] Dillon, J. (1994) UV-B as a pro-aging and pro-cataract factor, *Doc Ophthalmol* 88, 339-344.
- [7] Graw, J. (2009) Genetics of crystallins: Cataract and beyond, *Exp Eye Res* 88, 173-189.
- [8] Basak, A., Bateman, O., Slingsby, C., Pande, A., et al. (2003) High-resolution X-ray crystal structures of human gammaD crystallin (1.25A) and the R58H mutant (1.15A) associated with aculeiform cataract, *J Mol Biol* 328, 1137-1147.
- [9] Smith, M. A., Bateman, O. A., Jaenicke, R., and Slingsby, C. (2007) Mutation of interfaces in domain-swapped human betaB2-crystallin, *Protein Sci* 16, 615-625.
- [10] Van Montfort, R. L., Bateman, O. A., Lubsen, N. H., and Slingsby, C. (2003) Crystal structure of truncated human betaB1-crystallin, *Protein Sci* 12, 2606-2612.
- [11] Dixit, K., Pande, A., Pande, J., and Sarma, S. P. (2016) Nuclear Magnetic Resonance Structure of a Major Lens Protein, Human gammaC-Crystallin: Role of the Dipole Moment in Protein Solubility, *Biochemistry* 55, 3136-3149.
- [12]
- [13] Zhao L, Chen XJ, Zhu J, Zhang K, et.al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature*. 2015 Jul 30;523(7562):607-11.
- [14] Andley UP. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog Retin Eye Res*. 2007 Jan;26(1):78-98.

[15] Hains PG, Truscott RJ. Age-dependent deamidation of lifelong proteins in the human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jun;51(6):3107-14.

[16] 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 Jun14;53(7):3554-61

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

13. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

De acuerdo a las Definiciones de Riesgo de la Investigación del REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud:

Se trata de una investigación con riesgo mínimo pues se realizarán mediciones habituales durante la revisión oftalmológica de los participantes que no son invasivas.

Por otro lado la toma de muestra de catarata se extrae habitualmente durante la cirugía de catarata, por lo tanto no implica un procedimiento diferente.

ANEXOS

1) Hoja de recolección de datos 2) Consentimiento Informado

Recolección de Datos
Protocolo "ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS CRISTALINAS: DE LA CLÍNICA AL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CATARATA"

Nombre _____
 Edad _____ Género _____
 Numero de Registro _____ Fecha de elaboración _____

Antecedentes Personales no patológicos

Ocupación _____

Antecedentes Personales Patológicos

Tabaquismo _____
 Transfusiones _____
 Alergias _____
 Diabetes Mellitus II _____
 Hipertensión arterial _____
 Dislipidemia _____
 Otras: _____

Antecedentes Oftalmológicos:

Valoración preoperatoria

Ojo a operar	
Agudeza visual	
Presión intraocular	
Longitud Axial	
ACD	
Refracción	
Queratometrías	
CD	
CV	

Densidad de núcleo (PENTACAM)	
Paquimetría Corneal	
Fondo de ojo	

Fotografías clínicas/Clasificación de LOCS III

NO NC C P

Fecha de toma de fotografías:

Fecha de Cirugía

**PROYECTO DE INVESTIGACION:**

Análisis molecular de las proteínas cristalinas: De la clínica al diseño racional de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de catarata.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Liliana Quintanar Vera

INTRODUCCIÓN

Se le hace una cordial invitación para participar en la investigación médica sobre la catarata. La catarata es la principal causa de ceguera en el mundo y es responsable de los aproximadamente 45 millones de casos de ceguera que se producen en todo el mundo.

La catarata es la opacidad del lente natural del ojo debido a cambios en la estructura de las proteínas que lo conforman.

Las cristalinas son las proteínas del cristalino de ojo y tienen la función de mantener la transparencia y proporcionar un índice de refracción adecuado para el paso de la luz hacia la retina. Si cambian las proteínas del cristalino y pierden la transparencia, se opaca el cristalino y baja la visión.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es ampliar el conocimiento sobre el desarrollo de catarata mediante el análisis molecular de las proteínas cristalinas para poder desarrollar en un futuro nuevas estrategias de tratamiento. En este estudio se estudiarán los cambios de las proteínas del cristalino con catarata.

Se le ha seleccionado para participar porque tiene diagnóstico de catarata y se le realizará cirugía de catarata. Para decidir si participa usted debe tener conocimiento suficiente acerca de los procedimientos, beneficios y riesgos con el fin de tomar una decisión informada.

Procedimientos de la investigación médica

1. Se obtendrá información acerca de su historia clínica.
2. Se tomará la muestra de su catarata posterior a su cirugía
3. Se realizará un análisis molecular de los cambios de las cristalinas en la catarata

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

El resultado del estudio nos permitirá ampliar el conocimiento de la enfermedad para poder desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento.

RIESGOS O INCONVENIENTES

Este estudio no conlleva ningún riesgo para usted.

BENEFICIOS PARA USTED

Si usted decide participar contribuirá con el esfuerzo de investigadores mexicanos para ampliar el conocimiento que se tiene de la enfermedad de catarata.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

DERECHO A ABANDONAR LA INVESTIGACIÓN

Usted es libre de decidir si participa o no en este estudio de investigación. Si decide participar, puede cambiar de opinión y retirarse del estudio en el momento que lo decida. Si decide no participar, o si se retira, no afectará su relación con los médicos de su hospital tratante.

Yo, _____, he discutido sobre la investigación médica con la Dra. Francisca Domínguez Dufías, colaboradora y responsable del estudio clínico en Instituto Nacional de Rehabilitación y declaro lo siguiente:

1. He recibido información clara por escrito y entendido el propósito de esta investigación médica, la cual no contiene ningún riesgo para mí.
2. Comprendo que de participar en el estudio, se me tomará la muestra de mi catarata obtenida en la cirugía la cual será analizada, así como datos clínicos de mi expediente.
3. Se han atendido todas mis dudas acerca de la participación en la investigación, y entiendo que todas las dudas acerca de mi participación en el futuro también serán respondidas.
4. Mi participación en esta investigación es voluntaria.
5. Entiendo que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento sin perder ninguno de los beneficios a los cuales normalmente tendría derecho en el Instituto Nacional de Rehabilitación si no fuera parte de ningún protocolo.
6. Entiendo que no obtengo beneficio de participar en la investigación, salvo la satisfacción de sumarme con el esfuerzo de investigadores mexicanos para el estudio de las enfermedades.
7. Entiendo que mi información personal será resguardada confidencialmente y que se mantendrá en anonimato mi participación.
8. Se me ha entregado una copia de este formato de consentimiento.
9. Con este documento, doy mi libre consentimiento informado para participar en esta investigación médica.

Nombre completo del paciente: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Firma: _____

Fecha: _____

TESTIGO

Nombre completo: _____

Parentesco: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Firma: _____

Fecha: _____