



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO

**IDENTIFICACIÓN DE AGREGADOS AMILOIDES Y DE LA PROTEÍNA TAU HIPERFOSFORILADA EN
CATARATA SENIL (ADCAT181018)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL:
TÍTULO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA
EN:
OFTALMOLOGÍA

PRESENTA:
CRISTINA AURORA TLAPANCO BELTRÁN

TUTOR: DR. LUIS FERNANDO HERNÁNDEZ ZIMBRÓN

CIUDAD UNIVERSITARIA
OCTUBRE 26, 2021
CD. MX.



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.

**TITULO: IDENTIFICACIÓN DE AGREGADOS AMILOIDES Y DE LA
PROTEINA TAU HIPERFOSFORILADA EN CATARATA SENIL (ADCAT 181018)**

1.1 ÁREA DE ESTUDIO: Segmento anterior, investigación básica

1.2 AUTOR PRINCIPAL: Cristina Aurora Tlapanco Beltrán

1.4 TUTOR: Luis Fernando Hernández Zimbrón

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Cristina Aurora Tlapanco Beltrán

Residente de tercer año de Oftalmología en la Asociación Para Evitar la Ceguera en México, IAP

1.3

ADSCRIPCIÓN: - Asociación Para Evitar la Ceguera I.A.P.

FUNCIÓN PRINCIPAL: Dirección del estudio.

1.5 DEPARTAMENTOS PARTICIPANTES

Unidad de Investigación-APEC.

1.6 INSTITUCIONES PARTICIPANTES:

Asociación Para Evitar la Ceguera en México IAP.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 SÍNTESIS DEL PROYECTO.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC) y es la causa más frecuente de demencia y deterioro cognitivo leve (DCL) a nivel mundial.

Existen dos marcadores patológicos característicos en esta enfermedad; 1) la acumulación patológica de los péptidos beta amiloide 1-42 ($A\beta$ 1-42) p(E)3-42 y p(E)11-42) (denominados placas o agregados amiloides) debido a la sobreproducción de estos y 2) la hiperfosforilación de la proteína asociada a microtúbulos Tau (pTau), ambas alteraciones se presentan en áreas del cerebro asociadas a procesos de memoria y aprendizaje, aunque recientemente se ha demostrado que estas alteraciones también ocurren en áreas asociadas a procesos visuales (corteza visual y nervio óptico). Además, es necesario mencionar que el péptido $A\beta$ 1-42, se asocia a múltiples proteínas afectando su estructura y por lo tanto su correcta función, genera radicales libres y afecta las membranas celulares, por lo cual se considera un péptido tóxico.

Es bien conocido que muchos pacientes con EA leve presentan alteraciones visuales, como cambios en test electrofisiológicos, en visión de colores y alteraciones perimétricas. Uno de los tejidos que ha sido objeto de estudio es la retina y numerosos estudios han demostrado la existencia histopatológica de $A\beta$ 1-42 ocular en la EA y cambios anatómicos en la retina mediante tomografía de coherencia óptica (OCT). Por otro lado, varios estudios han demostrado la existencia de $A\beta$ 1-42 en humor acuoso (HA) y en el cristalino de pacientes con EA y sugieren la relación entre un subtipo de catarata específico y la EA.

Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo, han demostrado la presencia de los péptidos $A\beta$ 1-42, p(E)3-42 y p(E)11-42 y de la proteína pTau en la retina de ratón transgénico, sin embargo la presencia de estos péptidos y de la proteína pTau en catarata senil no ha sido demostrada.

El objetivo de este estudio es únicamente demostrar la presencia de los péptidos $A\beta$ 1-42 y p(E)3-42 así como la presencia de pTau en HA, cristalino y cápsula anterior de pacientes operados de catarata senil.

2.2. ANTECEDENTES

El humor acuoso (HA) y el líquido cefalorraquídeo (LCR) son fluidos extracelulares modificados que son responsables principalmente para nutrir varios tipos especializados de células en el ojo y en el cerebro, respectivamente, además de realizar una importante función hidromecánica (1).

Debido a un origen embriológico común (las estructuras oculares derivan del neuroectodermo). Existen autores que postulan que el ojo es un ventrículo más del cerebro y que sus plexos coroideos son los procesos ciliares del ojo. Puesto que en los procesos ciliares del ojo se produce HA, y ya que la composición del HA es

similar al LCR (2), creemos en la posibilidad de encontrar biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas (como los agregados amiloides y pTau) en HA, cristalino y capsula anterior.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia y se caracteriza por la presencia de placas extracelulares de β -Amiloide 1-42 ($A\beta$ 1-42) p(E)3-42 y p(E)11-42) y ovillos neurofibrilares intracelulares de proteína Tau anormalmente hiperfosforilada (p-Tau) en corteza prefrontal e hipocampo (3,4,5)

Aunque todos los seres humanos producen pequeñas cantidades de estos péptidos; pueden cumplir funciones fisiológicas y ser eliminados por diferentes mecanismos. Sin embargo, la sobreproducción de estos péptidos o fallas en los mecanismos de eliminación son la causa de la agregación y por lo tanto de la formación de las placas amiloides. Estas placas, así como grandes cantidades de péptido en circulación (forma soluble) son tóxicos para las células. Entre los mecanismos de toxicidad demostrados se encuentran lo siguientes; activación de diferentes vías de señalización asociadas a procesos de muerte celular, formación de poro mitocondrial, alteración de la permeabilidad de la membrana celular, generación de especies reactivas de oxígeno, procesos angiogénicos, dismunción de la producción de Adenosin Tri-Fosfato (ATP), asociación a proteínas asociadas a microtúbulos afectando el correcto transporte intracelular de proteínas y organelos celulares, activación de procesos inflamatorios (inflamósoma) entre otras alteraciones (6).

El diagnóstico definitivo de la EA es neuropatológico, sin embargo, mediante técnicas de neuroimagen funcional se puede demostrar la presencia de depósitos de péptidos amiloides, utilizando la tomografía por emisión de positrones (PET) con ligandos radioactivos específicos, como el Pittsburgh compound B (PiB) (6-15).

Actualmente se piensa que el acúmulo cerebral de $A\beta$ comienza hasta 20 años antes del inicio de clínica de demencia (16-18), lo que implica que existe una amplia ventana para el diagnóstico y tratamiento precoz cuando el daño neuronal es mínimo. Pese a todo, los biomarcadores de la EA aún constituyen un desafío como prueba de screening poblacional debido a su alto coste, la limitada disponibilidad y variabilidad intercentro (20-23).

Por otra parte, es bien conocido que muchos pacientes con EA leve presentan alteraciones visuales, como cambios en test electrofisiológicos, en visión de colores y alteraciones perimétricas. Uno de los tejidos, a nivel ocular, que ha sido objeto de estudio es la retina, ya que es un tejido que forma parte del sistema nervioso central y es accesible con técnicas de imagen no invasivas y económicas como la tomografía de coherencia óptica (OCT) (24-26). De hecho, existe evidencia histopatológica de que en los pacientes con EA se produce daño de las neuronas presentes en la retina (células ganglionares) y sus axones (capa de fibras nerviosas) (27).

Tripathi et al describieron hace casi 30 años la presencia de Tau (la fracción tau de la transferrina) en HA, además de en LCR (28).

Por otra parte, existen líneas de investigación que sugieren la relación entre un subtipo de catarata específico y la EA, aunque en la actualidad no se ha descrito si existe la presencia de estos agregados amiloides y la pTau exclusivamente en catarata senil.

Fundamentalmente se distinguen tres tipos de cataratas asociadas al envejecimiento ocular: catarata cortical, catarata nuclear y catarata sucapsular, según la clasificación LOCS III (Lens Opacities Classification System III) (29), el cual es el sistema más empleado en la actualidad por su buena correlación clínica y quirúrgica (30). Además, se ha observado A β en el citosol de las células del cristalino de pacientes con EA, sugiriendo una relación entre EA y cataratas de tipo cortical: postulan que el A β que se deposita en el cristalino promueve la agregación de proteínas y la formación de cataratas supranucleares (31).

Así mismo, el grupo de Moncaster confirmó en su estudio la existencia de un patrón característico de opacificación supranuclear del cristalino en pacientes con syndrome Down asociado al acúmulo de A β supranuclear (32). En contraposición, dos estudios recientes del grupo de Michael, contradicen a Goldstein y Moncaster. Dicho grupo ha publicado, analizando post-mortem el cristalino de pacientes con EA con microespectroscopia confocal de Raman y técnicas de inmunohistoquímica para diagnosticar A β en los tejidos, que las cataratas corticales no son típicas de la EA y no son un distintivo de acúmulo de A β , por tanto no puede ser considerado un biomarcador (33, 34, 37-39).

Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo, han demostrado la presencia de estos agregados amiloides y de la pTau en la retina y cristalino de ratones transgénicos que desarrollan la patología (3xTg-AD, Jackson Laboratories) (Artículo en preparación). , así como, en ratones de edad avanzada (C57/BL6) 18 meses de edad) (40)

Sin embargo, no existen reportes de la presencia de estos péptidos amino-truncados en cristalino y cápsula anterior de pacientes con catarata senil. La presencia de los agregados amiloides, así como, la hiperfosforilación de la proteína Tau en estos tejidos, podrían alterar la estructura y funcionamiento normal de las proteínas presentes en estos tejidos (alfa cristalinas por ejemplo) y eventualmente participar en el desarrollo de la catarata senil.

Por ello, creemos adecuado analizar la presencia de los agregados amiloides y de la proteína pTau en, cristalino y cápsula, ya que un mejor conocimiento de la presencia de estos marcadores en cataratas seniles podría ayudar a entender el proceso de su formación y posteriormente desarrollar nuevos estudios enfocados en la prevención de su formación.

2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las alteraciones visuales causadas por el envejecimiento tienen un efecto significativo en la calidad de vida y es necesario diferenciar entre funciones visuales reducidas por el envejecimiento normal y el envejecimiento de un paciente con alguna alteración fisiológica.

Se ha demostrado la presencia de agregados amiloides y de la proteína pTau en retina, cristalino y humor acuoso de algunos pacientes con la Enfermedad de Alzheimer que desarrollaron catarata. Es bien sabido, que la presencia de estos agregados amiloides, así como, la hiperfosforilación de Tau afectan la estructura y función de las proteínas, la comunicación intracelular y el correcto metabolismo celular en esta patología, y se ha sugerido que estas alteraciones podrían estar involucradas en el desarrollo de cataratas en estos pacientes. Sin embargo, la presencia y participación de estos agregados y de pTau en la formación de la catarata senil no ha sido descrita. Por lo tanto, el principal objetivo de este estudio es únicamente identificar la presencia de los agregados amiloides y de la proteína pTau en cristalino y en cápsula anterior de pacientes operados de catarata senil.

La generación de este conocimiento básico es muy importante ya que puede ayudarnos a obtener información preliminar sobre si estos marcadores podrían estar involucrados en la formación de catarata y a realizar estudios posteriores.

2.4 HIPÓTESIS.

Se identificará la presencia de los agregados amiloides y de la proteína Tau hiperfosforilada (A β 1-42, p(E)3-42 y pTau) en cristalino y cápsula anterior en pacientes con catarata senil.

2.5 OBJETIVOS.

Principal:

- Determinar la presencia de A β 1-42, p(E)3-42 y pTau en HA, cristalino y cápsula anterior de pacientes operados de catarata senil.

Secundarios:

- Determinar la concentración de los marcadores mencionados en HA, cristalino y cápsula en catarata senil.
- Realizar análisis de expresión de las enzimas involucradas en el procesamiento de los péptidos amiloides y de la hiperfosforilación de la proteína Tau

2.6 VARIABLES.

Principal:

- Presencia de A β 1-42, p(E)3-42 y pTau en HA, cristalino y cápsula de pacientes operados de catarata senil.

Secundarias:

- Tipo de catarata.
- Edad.

3. DISEÑO DEL ESTUDIO.

3.1 Investigación básica (Al tratarse de un estudio de investigación básica se considera experimental).

3.2 LUGAR DE ESTUDIO Y DURACIÓN.

Unidad de Investigación – Asociación para Evitar la Ceguera en México, Dr. Luis Sánchez Bulnes.

Servicio de segmento anterior- Asociación para Evitar la Ceguera en México, Dr. Luis Sánchez Bulnes.

El estudio tendrá una duración de 2 meses a partir de la aprobación del protocolo por los comités de ética en investigación e investigación de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.

4. POBLACIÓN:

4.1.1 Unidad de observación: ojo.

4.1.2 Universo: Pacientes con diagnóstico corroborado de catarata senil por clínica.

4.1.3 Método de muestreo: reclutamiento por conveniencia “convenience sampling”.

4.1.4 Obtención de la población: se reclutarán 30 pacientes atendidos en el hospital durante los meses del estudio que deseen participar y que sean presentados con alguno de los investigadores del estudio.

4.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- a) Pacientes mayores de 50 años.
- b) Diagnóstico clínico de catarata senil.
- c) Deseo de participar en estudio y que firmen consentimiento informado.
- d) Ausencia de antecedentes personal de enfermedad oftalmológica salvo catarata.

4.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- a) Menores de 50 años.

- b) Error refractivo -5D a +5D.
- c) Enfermedad de retina o vítreo (más comunes: retinopatía hipertensiva, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, oclusiones vasculares).
- d) Uveítis de cualquier tipo.

4.4 VARIABLES EN ESTUDIO:

- e) 4.1 Variable principal de desenlace: presencia de agregados amiloides y de la proteína Tau hiperfosforilada en catarata senil.

5. METODOLOGIA

5.1 TAMAÑO MUESTRAL:

Dado que en el momento actual no hay estudios indicando la presencia de estos marcadores en estas muestras, se realizará un estudio piloto que proporcionará una referencia para el cálculo muestral de un posible estudio en el futuro.

Al tratarse de un estudio piloto tal y como recomendado en la literatura no es necesario estimar el tamaño de muestra, siguiendo la evidencia científica se reclutará a un mínimo de 30 pacientes (41).

No se prevén pérdidas significativas de casos ya que la intervención se realiza en una única visita y no requiere seguimiento o reevaluación de los participantes.

5.2 DESCRIPCIÓN DE LAS MANIOBRAS PRINCIPALES:

Previo consentimiento informado, se incluirán pacientes que tengan diagnóstico temprana e intermedia previamente diagnosticada en el hospital. Se realizará historia clínica completa, así como interrogatorio dirigido a la patología de base y fecha de inicio de los síntomas visuales.

5.3 PROTOCOLO DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE CRISTALINO:

El cristalino opacificado será obtenido de pacientes sometidos a un procedimiento de extracción extracapsular de catarata. Para lo cual se hará la recolección de la catarata en un tubo de Eppendorf de 1.5ml con una solución de buffer de lisis, el cual será mantenido a 4°C en un contenedor para su posterior procesamiento.

5.4 PROTOCOLO DE ADQUISICIÓN DE CÁPSULA:

Se obtendrá la capsula anterior del cristalino, obtenida a partir de la capsulorrexis circular continua de aproximadamente 5.5mm, estándar durante la cirugía de facoemulsificación con o sin tinción de azul tripano, dado que no tiene implicación en el subsecuente análisis bioquímico posterior. La muestra será recolectada en un tubo de Eppendorf de 1.5ml con una solución de buffer de lisis, el cual será mantenido a 4°C en un contenedor para su posterior procesamiento.

5.5 PERÍODO DE OBSERVACIÓN

DIA	1	2
CONSENTIMIENTO INFORMADO	X	
Hª CLÍNICA	X	
OBTENCIÓN HA		X
OBTENCIÓN CRISTALINO		X
OBTENCIÓN DE CÁPSULA		X

Duración prevista del estudio: 2 meses

5.6 DETECCIÓN DE LOS AGREGADOS AMILOIDES:

Western blot

Para determinar la presencia de los agregados amiloides en cristalino y cápsula anterior se realizarán ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos para cada uno de estos marcadores.

Brevemente, se cuantificará la concentración total de proteína de cada una de las muestras por la técnica de Bradford. De cada una de las muestras se tomarán 50 ug de proteína totales y serán sometidas a electroforesis durante 50 minutos a 100 volts. Una vez terminada la electroforesis se realizará la electrotransferencia de las proteínas en el gel a una membrana de PVDF a 20 Volts durante 40 minutos.

Inmunodetección.

Las membranas de PVDF con las proteínas transferidas serán sometidas al proceso de inmunodetección. Primero, las membranas serán bloqueadas con Buffer de fosfatos (PBS)/Leche baja en grasas al 2% (PBS/Leche) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a utilizar.

Pasado el tiempo de bloqueo, se lavarán las membranas 3 veces con PBS/Tween 0.2% y serán incubadas por separado con el anticuerpo anti- A β 1-42, anti-beta amiloide p(E)3-42 y anti-pTAU (dilución 1:200 en PBS/Leche 0.2%/Tween 0.2%) toda la noche a 4 grados centígrados en agitación. Posteriormente, serán lavadas nuevamente con PBS/Tween 0.2% 3 veces y serán incubadas con los anticuerpos secundarios acoplado a peroxidasa (HRP) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

Finalmente, las membranas serán lavadas 3 veces para quitar el exceso de anticuerpo y se realizará la detección utilizando el kit de quimioluminiscencia (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Ensayos de ELISA

Para determinar la concentración de los marcadores mencionados en los dos tipos de muestra se realizarán ensayos de ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), utilizando kits comerciales (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6. ASPECTOS ÉTICOS

6.1 Hoja de información y formulario de consentimiento informado

El estudio se llevará a cabo de acuerdo con las recomendaciones para estudios de investigación hecha en seres humanos y siguiendo las Normas de Buena Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki, última revisión Seúl (2008) y en la actual Legislación Mexicana en materia de proyectos de investigación clínica.

Todos los participantes antes de iniciar el estudio serán informados y darán su consentimiento por escrito. Al participante se le entregará una copia de esta hoja de información para que se la lleve consigo.

6.2 Confidencialidad de datos

La información difundida y obtenida por la puesta en marcha del presente estudio es considerada confidencial y deberá ser tratada en todo momento como tal. Los sujetos del estudio se identificarán con un código numérico. Sólo aquellos datos de la historia clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación se hará en la medida de lo posible en presencia del Investigador Principal/Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el estudio. Los datos recogidos para el estudio

estarán identificados mediante un código y solo el investigador principal/colaboradores podrán relacionar dichos datos con la historia clínica.

El tratamiento de los datos se hará con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley de protección de datos personales.

Se anexa consentimiento informado al final de este documento.

7. RECURSOS.

7.1 Recursos humanos:

Se necesitará el apoyo técnico de 1 estudiante de servicio social, además de los co-autores ya mencionados.

7.2 Recursos materiales:

Se necesitarán consumibles de laboratorio (microtubos eppendorf, pipetas Pasteur de plástico, laminillas, cubre-objetos, anticuerpos, anticuerpos acoplados a fluorescencia, reactivos diversos, entre varios más).

7.3 Recursos del Hospital:

Agudeza visual, acceso a expediente electrónico

7.4 Financiamiento:

Este proyecto académico contará con financiamiento por parte de la Unidad de Investigación de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México.

7.5 Plan de trabajo

Los investigadores se atenderán a las normas de Buena Práctica Clínica y conocerán y seguirán los procedimientos normalizados de trabajo del Servicio. Toda la información recogida durante la realización del estudio se anotará directamente en el cuaderno de recogida de datos, que se adjunta como anexo I y que se mantendrá en la más estricta confidencialidad, a las que sólo tendrán acceso los investigadores que participen en el estudio y las autoridades competentes. Cuando se haga una corrección se deberá anotar la fecha y las iniciales de la persona que la realiza a la que añadirá su firma.

El investigador tendrá escrito y fechado el informe de aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente, consentimiento informado y toda la documentación necesaria según legislación vigente antes de dar comienzo la realización del estudio.

El personal auxiliar seguirá las instrucciones dadas por el investigador en cuanto a las extracciones de muestras de sangre, su manejo y demás exploraciones complementarias.

Previo al estudio, los pacientes deberán recibir información oral y escrita con respecto al diseño, fines del estudio y posibles riesgos que de él puedan derivarse. Si posteriormente acceden a participar en el mismo, deberán firmar su consentimiento, sin que ello impida que en cualquier momento y por cualquier razón puedan revocarlo y abandonar el estudio.

Los pacientes recibirán instrucciones respecto a la necesidad de respetar estrictamente las instrucciones de los investigadores. Se informará de la necesidad de ponerse en contacto con los investigadores si durante el estudio surgiera alguna incidencia, facilitándoles la forma de hacerlo.

7.6 Difusión de resultados

Si los resultados derivados del presente estudio se desean publicar, se requerirá la aprobación de los investigadores y del promotor. Asimismo, se respetará siempre la confidencialidad de la identidad de los sujetos participantes.

7. RESULTADOS

Las cápsulas del cristalino fueron recolectadas de 10 pacientes con diabetes mellitus confirmada clínicamente y por patología (edad media 68.59 +/- 2.9 años, con un rango de 56-84 años, 5 femeninos y 5 masculinos) y 9 controles sanos (edad media 68.75 +/- 4 años, con un rango de 58-78 años, 5 femeninos y 4 masculinos). El análisis de las cápsulas de cristalino tiñeron para los clusters anti A β N 3-42 y A β N 11-42 de depósitos A β en la cápsula de cristalino de los pacientes con diabetes mellitus. La tinción de hematoxilina y eosina de la cápsula anterior revelaron alteraciones de células epiteliales del cristalino en las muestras de los pacientes con diabetes mellitus, tales como pérdida de las uniones intracelulares, evidenciado por retracción celular y discontinuidad epitelial, así como vacuolización citoplasmática en comparación con los pacientes no diabéticos.

El grupo representativo de pacientes y controles tuvieron una edad entre los 60-90 años. Los sujetos controles ocasionalmente demostraron depósitos retinianos de A β difusos y dispersos, en concordancia con el estudio cerebral de patología. Las imágenes de alta magnificación mostraron diversos tipos de depósitos A β en las retinas con pacientes con enfermedad de Alzheimer, incluyendo placas clásicas, difusas y compactas. La morfología de la placa clásica A β que a veces se ve en los cerebros de los pacientes con enfermedad de Alzheimer también fueron detectados en la cápsula de cristalino. Una comparación entre las retinas y los respectivos cerebros de dos pacientes adicionales indicaron una semejanza en la morfología de la placa A β . Estos pacientes fueron diagnosticados con angiopatía amiloide cerebral y exhibieron depósitos retinianos A β asociados con la vasculatura.

La examinación histológica hizo evidentes los depósitos A β clásicos y neuríticos con incremento en las placas retinianas de A β 42, así como pérdida neuronal en los pacientes con enfermedad de Alzheimer versus los controles.

Las placas retinianas A β imitaron la patología cerebral, especialmente en la corteza visual primaria.

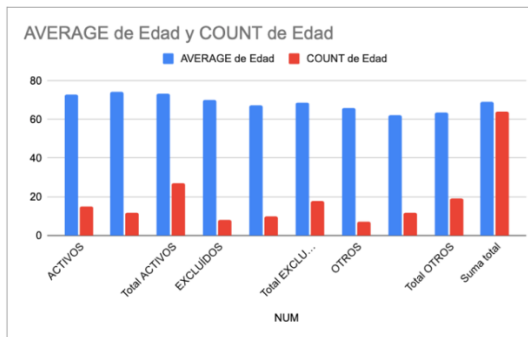
Los depósitos retinianos frecuentemente se asociaron a vasos sanguíneos y ocurrieron en regiones periféricas del cuadrante superior y en las capas internas de la retina. La microscopía electrónica de transmisión reveló un ensamble del depósito A β en protofibrillas y fibrillas. Además, la habilidad de demostrar depósitos amiloides retinianos con curcumina sólida-lípida y un oftalmoscopio con láser de scanning modificado fue demostrado en pacientes vivos. Un cálculo automatizado del índice de amiloide retiniano, la cual es una medida cuantitativa del incremento de fluorescencia de curcumina, fue construido. Análisis de los puntajes RAI demostraron un incremento en el doble de pacientes versus controles.

Para explorar la relación de proteínas glucosiladas con estos cambios histológicos, realizamos inmunohistoquímica con la lectina Con A, observando diferencias en la intensidad de las tinciones entre los grupos. Para los no diabéticos, la tinción de Con A fue homogénea en el citoplasma y en la membrana pero para los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, en adición al marcaje de la membrana y citoplasma, se obseraron vesículas perinucleares con alta reactividad a Con A. Cuando las cápsulas fueron tratadas con tripsina por más de 6 horas, el marcaje con Con A disminuyó considerablemente; sin embargo, el marcaje con Con A disminuyó considerablemente. La disminución en la luz de las vesículas positivas a Con A en las muestras de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 sugieren una resistencia al tratamiento con tripsina.

Estas observaciones nos llevaron a examinar el perfil electroforético entre ambos grupos. Observamos diferencias entre los extractos de proteínas de los pacientes diabéticos a los no diabéticos con la tinción azul de Coomassie, observando un incremento en la densidad de las bandas de 147, 64 y 23 kDa en las cápsulas de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Después de estos hallazgos se demostró que el sitio de proteínas de 250 a 15 kDa con mayores áreas de concentración en los puntos isoelectricos de 4-8. En las muestras de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, se observó un punto con mayor densidad comparándolo con muestras de los no diabéticos, de 70 kDa con un punto isoelectrico de 5.5.

Finalmente, se realizó un blot de lectina con Con A, lo cual confirmó la presencia de una banda de 65 kDa en la muestras de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, no detectados en las muestras de pacientes no diabéticos, sugiriendo la presencia de CK-1/2 glucosilada en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

TIPO PARTICIPANTE	Sexo	AVERAGE de Edad	COUNT de Edad
ACTIVOS	FEM	73	15
	MASC	74	12
Total ACTIVOS		73	27
EXCLUÍDOS	FEM	70	8
	MASC	67	10
Total EXCLUÍDOS		69	18
OTROS	FEM	66	7
	MASC	62	12
Total OTROS		63	19
Suma total		69	64



8. DISCUSION

Existen estudios realizados por Goldstein y cols. (2003) y Moncaster y cols. (2010) que concluyen que en las cataratas existe acumulación de beta amiloide en aquellos pacientes con Enfermedad de Alzheimer y Síndrome de Down, lo cual no sucede en los pacientes sin cataratas¹. Por otro lado, Frederikse (2000) concluyó que la acumulación de amiloide también ocurre relacionado a la edad en sujetos sin patologías¹. Además, estudios de microscopía electrónica e histología en cataratas de pacientes con enfermedad de Alzheimer y en pacientes controles han demostrado que tienen una ultraestructura similar ¹. Existe información de que el estrés oxidativo activa factores AP-1 en células epiteliales cristalinas de monos y conejos e inducen expresión de péptido beta amiloide³. Dicho péptido es tóxico y se piensa que contribuye a la generación de catarata³.

La formación de beta amiloide requiere del precursor de proteína amiloide, el cual se ha encontrado en la retina de ratones¹. El cristalino también sufre cambios degenerativos asociados a la edad, tales como el depósito progresivo de proteínas insolubles y daño oxidativo². Es importante destacar que existe evidencia de que el péptido amiloide es expresado en el cristalino de monos³.

En este estudio se encontraron clusters anti A β N 3-42 y A β N 11-42 de depósitos A β en la cápsula de cristalino de los pacientes con diabetes mellitus. Además, en estos mismos pacientes se encontraron alteraciones de células epiteliales de cristalino, pérdida de las uniones intracelulares, vacuolización citoplasmática y discontinuidad epitelial. Asimismo, se detectaron placas clásicas A β en las cápsulas de cristalino en pacientes diabéticos, las cuales también se han encontrado en estudios previos en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Es importante mencionar que en este estudio únicamente se analizaron cápsulas anteriores de cristalinos, ya que existe evidencia por parte de otros autores de que existe el péptido A β en otros compartimentos intracelulares⁴. El péptido precursor de beta-amiloide (y por lo tanto el péptido beta-amiloide) está contenido en los organelos, los cuales se desintegran y es por eso que dicho péptido se libera en el citosol². Los datos recientes

de inmunohistoquímica realizados tanto en cristalinos de ratas como en humanos sugieren que el péptido beta amiloide favorece la generación de cataratas corticales en su mayoría, ya que dicho péptido se encuentra principalmente en las regiones epiteliales y corticales del cristalino 3.

9. CONCLUSION

En conclusión, la formación de catarata es un proceso complejo que incluye la agregación proteica y lesión por citotoxicidad, lo cual es una característica que también tiene la enfermedad de Alzheimer y otras patologías productoras de péptido beta amiloide. El estrés oxidativo juega un papel fundamental en inducir la producción del péptido beta amiloide, lo cual sugiere que las manifestaciones de las enfermedades productoras de amiloide pueden variar en los diferentes tejidos, dependiendo de la cantidad de exposición al daño oxidativo. En este estudio se encontró la presencia del péptido beta amiloide en mayor proporción en los pacientes diabéticos que en los no diabéticos.

8. REFERENCIAS:

1. Michael R et al. Absence of beta-amyloid in cortical cataracts of donors with and without Alzheimer's disease. *Experimental Eye Research* 2012; 106: 5-13
2. Goldstein et al. Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *The Lancet* 2003; 361:1258-1265
3. Frederikse et al. Oxidative Stress Increases Production of Amyloid Precursor Protein and Amyloid (A) in Mammalian Lenses, and A Has Toxic Effects on Lens Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271: 10169-10174
4. Skovronsky et al. Detection of a Novel Intraneuronal Pool of Insoluble Amyloid Beta Protein that Accumulates with Time in Culture. *The Journal of Cell Biology* 1998; 141: 1031-1039
5. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci*. 1998;1(5):355–358.
6. Kang S, Jeong H, Baek JH, Lee SJ, Han SH, Cho HJ, et al. PiB-PET imaging-based serum proteome profiles predict mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2016;53:1563–76.
7. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 2004;55:306–19.
8. De Souza LC, Chupin M, Lamari F, et al. CSF tau markers are correlated with hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012;33:1253–57.
9. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, et al. Cerebrospinal fluid β -amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 2009; 66: 382–89.
10. Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, et al. Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett* 2001;297:187–90.

11. Ost M, Nylen K, Csajbok L, et al. Initial CSF total tau correlates with 1-year outcome in patients with traumatic brain injury. *Neurology* 2006; 67: 1600-04.
12. Buerger K, Ewers M, Pirttila T, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 2006; 129: 3035-41.
13. Seppala TT, Nerg O, Koivisto AM, et al. CSF biomarkers for Alzheimer disease correlate with cortical brain biopsy findings. *Neurology* 2012;78:1568-75.
14. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2010; 6: 131-44.
15. Schott JM, Petersen RC. New criteria for Alzheimer's disease: which, when and why? *Brain* 2015; 138: 1134-37.
16. Bateman RJ, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2012;367(9):795-804.
17. Bilgel M, et al. Individual estimates of age at detectable amyloid onset for risk factor assessment. *Alzheimers Dement*. 2016;12(4):373-379.
18. Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature*. 2009;461(7266):916-922.
19. Salloway S, Sperling R, Fox NC, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014; 370: 322-33.
20. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2016 Jun;15(7):673-684
21. Blennow K, Mattsson N, Schöll M, Hansson O, Zetterberg H. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(5):297-309.
22. Khan TK, Alkon DL. Alzheimer's disease cerebrospinal fluid and neuroimaging biomarkers: diagnostic accuracy and relationship to drug efficacy. *J Alzheimers Dis*. 2015;46(4):817-836.
23. Tu P, Fu H, Cui M. Compounds for imaging amyloid- β deposits in an Alzheimer's brain: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(4):413-423.
24. The Retina. In: Purves D, et al, eds. *Neuroscience*. 2nd ed. Chapters 11 and 12. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.
25. Byerly MS, Blackshaw S. Vertebrate retina and hypothalamus development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009;1(3):380-389.
26. Trost A, et al. Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:20.
27. Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA. Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1986;315:485-487.

28. Tripathi RC1, Millard CB, Tripathi BJ, Noronha A. Tau fraction of transferrin is present in human aqueous humor and is not unique to cerebrospinal fluid. *Exp Eye Res.* 1990;50(5):541-7.
29. Chylack LJ, Wolfe JK, Singer DM, Leske MC, Bullimore MA, Bailey IL, et al. The Lens Opacities Classification System III. The Longitudinal Study of Cataract Study Group. *Arch Ophthalmol.* 1993;111(6):831-6
30. Davison JA1, Chylack LT. Clinical application of the lens opacities classification system III in the performance of phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(1):138-45.
31. Goldstein LE, Muffat JA, Cherny RA, Moir RD, Ericsson MH, Huang X, Mavros C. Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *Lancet.* 2003 Apr 12;361(9365):1258-65.
32. Moncaster JA, Pineda R, Moir RD, Lu S, Burton MA, Ghosh JG, Ericsson M, et al. Alzheimer's disease amyloid-beta links lens and brain pathology in Down syndrome. *PLoS One.* 2010;20;5(5).
33. Michael R, Otto C, Lenferink A, Gelpi E, Montenegro GA, Rosandić J, et al. Absence of amyloid-beta in lenses of Alzheimer patients: a confocal Raman microspectroscopic study. *Exp Eye Res.* 2014;119:44-53.
34. Michael R, Rosandić J, Montenegro GA, Lobato E, Tresserra F, Barraquer RI, Vrensen GF. Absence of beta-amyloid in cortical cataracts of donors with and without Alzheimer's disease. *Exp Eye Res.* 2013; 106: 5-13.
35. Emmett SE1. ICP-MS: a new look at trace elements in Alzheimer's disease. Prog Clin Biol Res.1989;317:1077-86.
36. Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, et al. Plasma A(beta)40 and A(beta)42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 2003;61:1185–1190.
37. Reniewska B, Mulak M, Misiuk-Hojło M, Kostus' E. Coexistence of Alzheimer's disease with pseudoexfoliation syndrome PEX. *Klin Oczna* 2004;106:107–109.
38. Lui JK, Laws SM, Li QX, Villemagne VL, Ames D, Brown B, et al. AIBL Research Group plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging. *J Alzheimer's Dis* 2010;20:1233–1242.
39. Baranowska-Bik A, Bik W, Wolin' ska-Witort E, Martyn' ska L, Chmielowska M, Barcikowska Met al. Plasma beta amyloid and cytokine profile in women with Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol Lett* 2008;29:75–79.
40. Hernández-Zimbrón, L. F., & Rivas-Arancibia, S. (2014). Deciphering an interplay of proteins associated with amyloid β 1-42 peptide and molecular mechanisms of Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, 25(6), 773-783.
41. Eguchi S, Matsui S, Huang SY, Hsiao CK. Statistical analysis of biomarkers for personalized medicine. *Comput Math Methods Med.* 2013;2013:467420.

42. Tripathi R., Millard C., Tripathi b. and Noronha A. Tau Fraction of Transferrin is Present in Human Aqueous Humor and is not Unique to Cerebrospinal Fluid. *Eye Res* 1990; 50:541-547.
43. Physiology and chemistry of cerebrospinal fluid, aqueous humor and endolymph in *Squalus acanthias*. Maren TH. *J Exp Zool.* 1977 Mar;199(3):317-24
44. Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2016;12(4):459–509.
45. De Strooper B, Karran E. The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell.* 2016;164(4):603–615.