



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL

TESIS

“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL CONFORMADAS EN PACIENTES DIABÉTICOS CON CATARATA”

PRESENTA

Beatriz Eugenia Torres Bernal

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COMITÉ TUTORIAL

DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ

DR. RAFAEL GUTIEREZ CAMPOS

DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ

AGUASCALIENTES; AGS., JUNIO DEL 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

M. en C. BEATRIZ EUGENIA TORRES BERNAL
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.

Estimado (a) alumno (a) Torres:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "ANÁLISIS DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL CONFORMADAS EN PACIENTES DIABÉTICOS CON CATARATA", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 26 de mayo de 2014
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



ccp.- Archivo
JRG:mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES



ANIVERSARIO UAA

Aguascalientes, Ags. A 12 de mayo 2014

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos,
Decano del Centro de Ciencias Básicas y Presidente del
CONSEJO ACADÉMICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Centro de Ciencias Básicas,
Universidad Autónoma de Aguascalientes,
Presente:

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la Estudiante del doctorado en Ciencias Biológicas, M. en C. Beatriz Eugenia Torres Bernal, ha cumplido con las actividades y metas planteadas en el proyecto doctoral titulado "ANÁLISIS DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL CONFORMADAS EN PACIENTES DIABÉTICOS CON CATARATA". La presente se extiende debido a que la aspirante ha cumplido con los créditos correspondientes al posgrado y sus resultados han sido aceptados para publicarse en el artículo "Unfolded protein response (UPR) activation in cataracts (JCRS-13-1058R1) en la revista Journal of Cataract and Refractive Surgery", los abajo firmantes hemos revisado el contenido de la tesis y estamos de acuerdo con el contenido de la misma, para continuar con los procedimientos de su titulación.

Sin más por el momento, nos despedimos de usted con un afectuoso saludo.

Atentamente,


Dr. Javier Ventura Juárez
Co-Director de tesis


Dr. Rafael Gutiérrez Campos
Co-Director de tesis

Asesor: Dr. David Kershenobich Stainikowitz
Miembro del Comité Tutorial





DICTAMEN DE REVISIÓN DE LA TESIS / TRABAJO PRÁCTICO

DATOS DEL ESTUDIANTE	
NOMBRE: BEATRIZ EUGENIA TORRES BERNAL	ID (No. de Registro): 11260
PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS	ÁREA: PATOLOGÍA EXPERIMENTAL
TUTOR/TUORES: DR. JAVIER VENTURA JUAREZ/ DR. RAFAEL GUTIERREZ CAMPOS	
<p style="text-align: center;">TESIS (<input checked="" type="checkbox"/>) TRABAJO PRÁCTICO (<input type="checkbox"/>)</p>	
OBJETIVO: ANALIZAR LA PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL CONFORMADAS EN PACIENTES CON COMPLICACIONES OCULARES SECUNDARIAS A DIABETES MELLITUS	
DICTAMEN	
CUMPLE CON CRÉDITOS ACADÉMICOS:	(SI)
CONGRUENCIAS CON LAS LGAC DEL PROGRAMA:	(SI)
CONGRUENCIA CON LOS CUERPOS ACADÉMICOS:	(SI)
CUMPLE CON LAS NORMAS OPERATIVAS:	(SI)
CONDICIONANCIA DEL OBJETIVO CON EL REGISTRO:	(SI)

Aguascalientes, Ags. a 13 de Mayo De 2014

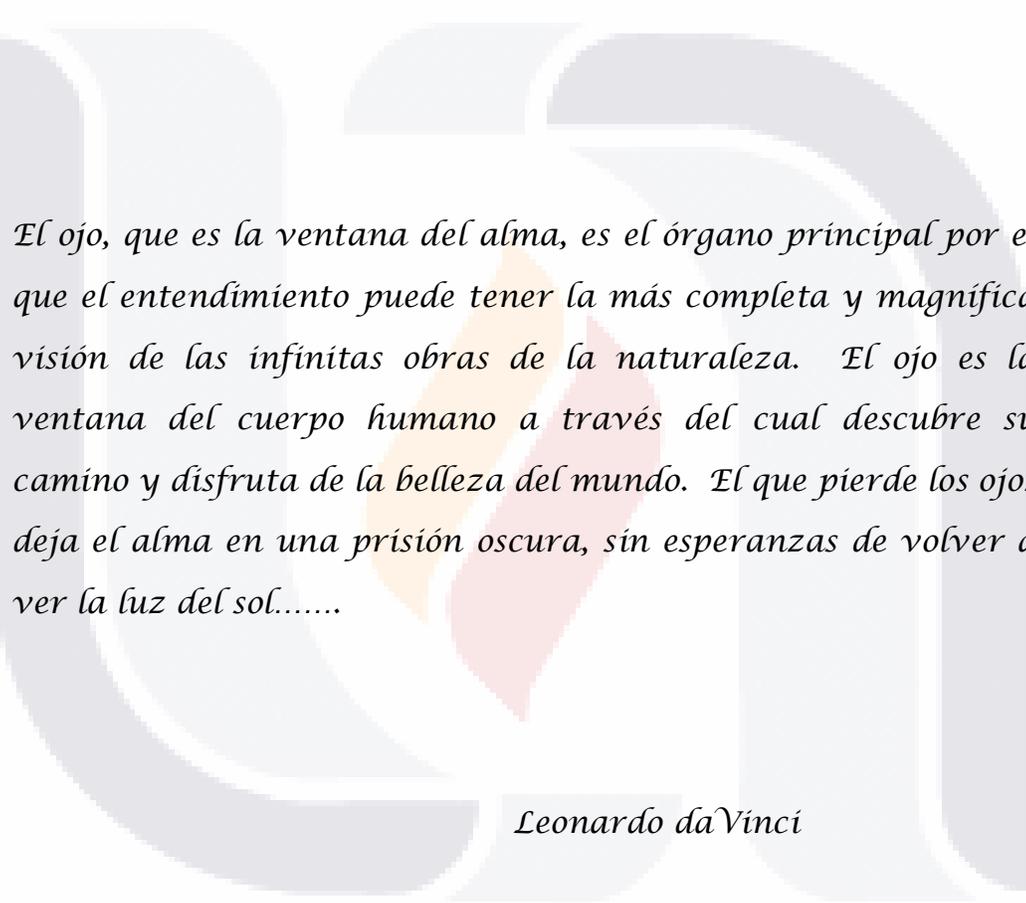
FIRMAS


 DR. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA


 DRA. MA. CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SALDAÑA


 DR. JUAN JAUREGUI RINCÓN

Código: FO-040200-23
 Revisión: 00
 Emisión: 21/02/11



El ojo, que es la ventana del alma, es el órgano principal por el que el entendimiento puede tener la más completa y magnífica visión de las infinitas obras de la naturaleza. El ojo es la ventana del cuerpo humano a través del cual descubre su camino y disfruta de la belleza del mundo. El que pierde los ojos deja el alma en una prisión oscura, sin esperanzas de volver a ver la luz del sol.....

Leonardo da Vinci

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por permitirme ser parte de esta casa de estudios

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico.

Al Dr. Javier Ventura Juárez por siempre tener el tiempo y disponibilidad, por su constante apoyo, paciencia y todas sus enseñanzas, mi más profundo agradecimiento.

Al Dr. Rafael Gutiérrez Campos por el tiempo dado en el desarrollo de este trabajo y por su gran disposición para resolver siempre todas las dudas.

Al Dr. David Kershenobich Stalnikowitz por formar parte de este proyecto.

A la Biol. Araceli Adabache Ortiz, por su valioso tiempo y colaboración para poder obtener grandiosas imágenes.

A la Dra. Rosario Campos Esparza por sus consejos y enseñanzas. Gracias.

A mis compañeros en el doctorado y a todo el personal del laboratorio de Morfología; Fabiola, Sandra, Martín, Manuel, Esperanza, Anita gracias a su apoyo y buen humor hicieron que este tiempo fuera una gran experiencia.

DEDICATORIA

A Dios, por guiar mi camino en cada momento, darme fuerza cuando más lo he necesitado y vida para poder llegar a este momento.

A mi esposo Gerardo, por tu inmenso amor, por tu apoyo, paciencia y buenos consejos.

A mis hijos, Luis Gerardo, Rafael y Ana Valeria quienes son el motor de mi vida y que sin saber me regalaron valioso tiempo para poder crecer como persona y desarrollar este trabajo.

A mis padres, por su amor incondicional, por sus enseñanzas y buen ejemplo y sobre todo por estar siempre ahí y ser una bendición en mi vida.

A mis hermanos y hermanas, Humberto, Luis, Daniel, Carolina y Mónica por estar conmigo en cada momento de mi vida y por ser mis grandes compañeros de vida.

A mi hermano Luis Fernando, quien fue el creador de este proyecto. Como siempre hermano mil gracias por tu amor, por tu apoyo y por estar siempre ahí con una palabra de aliento y enseñarme que sin Dios no podemos nada.

A la Dra. Ruth Isabel Solís Arias, gracias por todo tu apoyo.

A Guilda Guzmán Colis, gracias por todo el cariño y ánimo que siempre me das.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL .. 1

INDICE DE TABLAS .. 3

INDICE DE FIGURAS ... 4

ACRONIMOS..... 5

RESUMEN .. 6

ABSTRACT .. 7

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Diabetes mellitus* .. 9

1.1.1 Metabolismo de la Glucosa .. 9

1.1.2 Clasificación de la *diabetes mellitus* ... 10

1.1.3 Consideraciones Epidemiológica .. 12

1.2 Complicaciones crónicas de la *diabetes mellitus* .. 13

1.2.1 Complicaciones oculares .. 13

1.3 Cristalino .. 16

1.3.1 Anatomía y fisiología del cristalino .. 16

1.3.2 Proteínas del cristalino .. 18

1.3.3 Bioquímica del cristalino .. 20

1.3.4 Glutatión y Acido ascórbico como mecanismos protectores del estrés oxidativo en el cristalino .. 21

1.4 Mecanismo patogénico de las complicaciones oculares .. 22

1.4.1 Cataratas .. 22

1.5 Respuesta a proteínas mal conformadas .. 24

2. ANTECEDENTES .. 30

3. JUSTIFICACIÓN .. 32

4. **HIPOTESIS Y OBJETIVOS** 34

5. **METODOLOGÍA** 36

5.1 Material de Estudio 37

5.2 Procesamiento de las muestras .. 38

6. **RESULTADOS** 43

6.1 Muestras obtenidas .. 44

6.2 Análisis morfológico .. 45

6.3 Presencia del regulador GRP78 en células del cristalino .. 48

6.4 Presencia de ATF6 en células del cristalino ... 50

6.5 Cuantificación de marcas de oro coloidal en imágenes del microscopio electrónico de transmisión .. 53

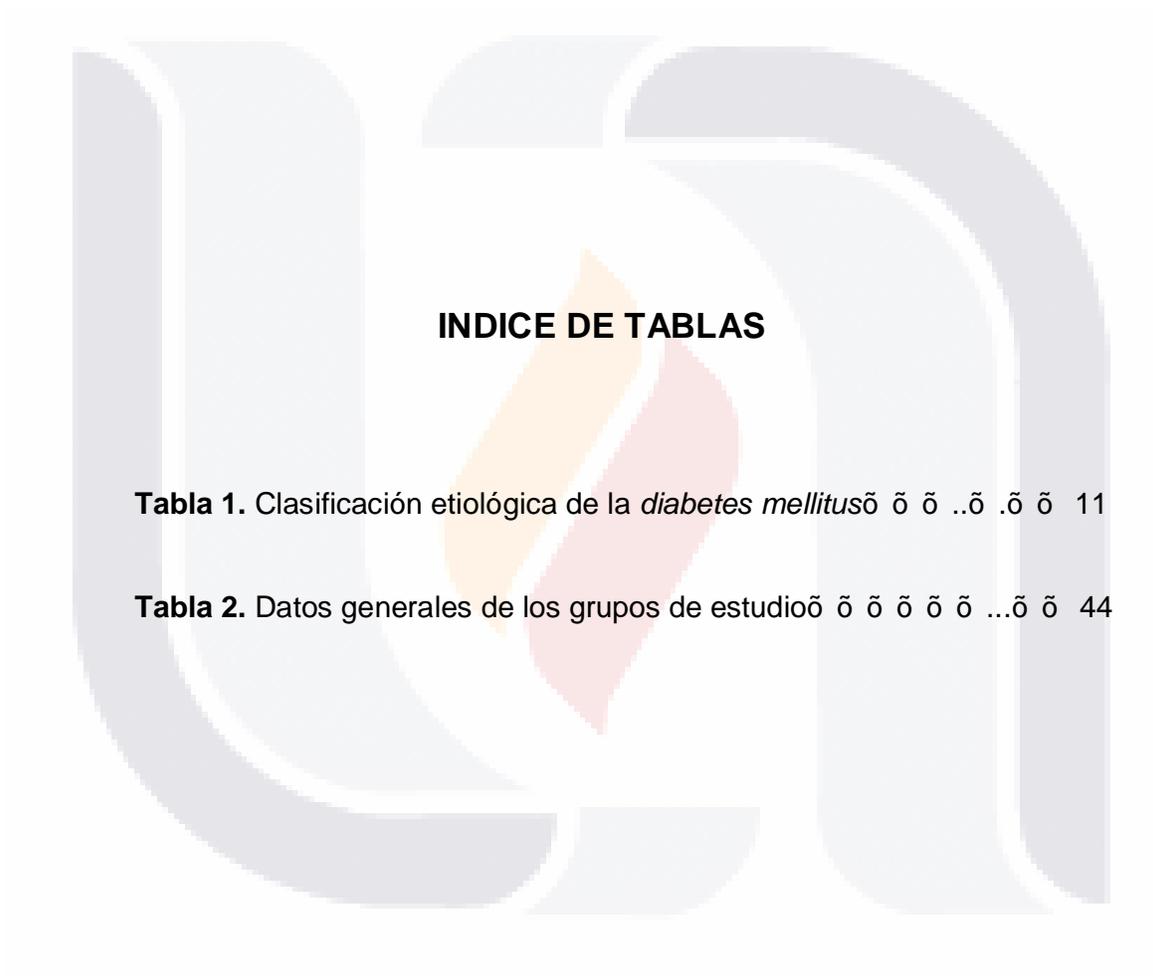
7. **DISCUSIÓN** .. 56

8. **CONCLUSIÓN** .. 61

GLOSARIO .. 63

BIBLIOGRAFIA .. 64

ANEXO .. 70



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación etiológica de la *diabetes mellitus* 11

Tabla 2. Datos generales de los grupos de estudio 44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aparición de catarata ò ò ò ò ò ò ò ò ...ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò 14

Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de superficie posterior de cristalino ò 16

Figura 3. Corte histológico del cristalino ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ...ò ò ò ò .ò 17

Figura 4. Descripción de las proteínas del cristalino ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò 18

Figura 5. División esquemática de la bioquímica del cristalino ò ò ò ò ò ò 21

Figura 6. Principales vías metabólicas en la hiperglucemia ò ò ò ò ò ò ò ò ...ò 24

Figura 7. Esquema de componentes básicos de la RPMC ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò .ò 25

Figura 8. Primer brazo de la RPMC ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ... 26

Figura 9. Segundo brazo de la RPMC ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò òò 27

Figura 10. Cristalino normal de paciente sano ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ..ò 44

Figura 11. Cristalino con catarata senil ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò .. 45

Figura 12. Imágenes tomadas con MEB de Cristalino de persona sana ò ò ò . 47

Figura 13. Imágenes de MEB de Cristalinos con Cataratas ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ... 47

Figura 14. Expresión del regulador maestro GRP78 por Inmunohistoquímica ò ò 49

Figura 15. Expresión del regulador maestro GRP78 por inmunofluorescencia ò ò 49

Figura 16. Expresión del regulador maestro GRP78 por inmuno-oro de 20 nm..... 50

Figura 17. Expresión del transductor ATF6 por Inmunohistoquímica ò ò ò ò ...ò 51

Figura 18. Expresión del transductor ATF6 por inmunofluorescencia ò òò 51

Figura 19. Expresión del transductor ATF6 por inmuno-oro de 20 nm ò ò ò ò ò ò . 52

Figura 20. Cuantificación de marca de oro coloidal de GRP78 y ATF6 en MET ò .53

ACRONIMOS

Abreviatura	Significado
RPMC	Respuesta a Proteínas Mal Conformadas
DM	Diabetes mellitus
PTI	Fosfatidilinositol
IP3	Inositoltrifosfato
DAG	Diacilglicerol
GLUT	Transportadores de Glucos
MCG	Complejo mayor de histocompatibilidad
RD	Retinopatía diabética
MIP	Proteína intrínseca mayor
GRP78	Proteína regulada por la glucosa
Ire1	Proteína transmembranal cinasa/endoribonucleasa
ATF6	Factor de transcripción activado 6
ERSE	Elemento al estrés en el retículo endoplasmático
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
BH	Biometría Hemática Completa
QS3	Química sanguínea de 3 elementos
EGO	Examen general de orina
Hb1Ac	Hemoglobina glicosilada
EKG	Electrocardiograma
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MET	Microscopio electrónico de transmisión
PBS	Buffer de fosfato salino
BSA	Albumina sérica bovina
DAB	Diaminobencidina
NL	Cristalino normal
SCL	Cristalino con catarata senil
DCL	Cristalino con catarata diabética

RESUMEN

OBJETIVO. Analizar la expresión de GRP78 y ATF6, dos de los actores principales de la respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC) en cataratas seniles y diabéticas.

DISEÑO. Se realizó un estudio prospectivo, experimental, descriptivo y transversal.

METODOS. Se midió la expresión cualitativa y cuantitativa de GRP78 y ATF6 in en muestras quirúrgicas de 11 pacientes con cataratas seniles, 9 con cataratas diabéticas y 3 cristalinos normales. Ambas proteínas fueron detectadas por técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica con anticuerpos de oro coloidal. También se realizó morfometría cuantitativa para analizar las diferencias en GRP78 y ATF6 entre muestras. Se usó para el análisis estadístico la prueba de Mann-Whitney.

RESULTADOS. Por microscopía electrónica de barrido en los cristalinos normales encontramos la organización característica de las fibras en el cristalino, se observaban perfectamente alineadas y con interdigitaciones. Los cristalinos de pacientes con cataratas seniles o diabéticas mostraron fibras cristalinas con el mismo patrón de desalineación y desorganización entre ellas. Las proteínas GRP78 y ATF6 se detectaron a través de inmunofluorescencia en los cristalinos con cataratas seniles y diabéticas, pero no en los cristalinos normales. Al usar la técnica de inmuno-oro con el microscopio electrónico de transmisión encontramos que en los tejidos con cataratas diabéticas, los gránulos de oro coloidal en GRP78 y ATF6 eran 30 y 35% más, comparado con los de las cataratas seniles ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES. Nuestros resultados mostraron por primera vez, que GRP78 y ATF6 están presentes en los cristalinos con cataratas seniles y diabéticas, estableciendo que la respuesta a proteínas mal conformadas puede ser importante en el proceso de caratogenesis.

ABSTRACT

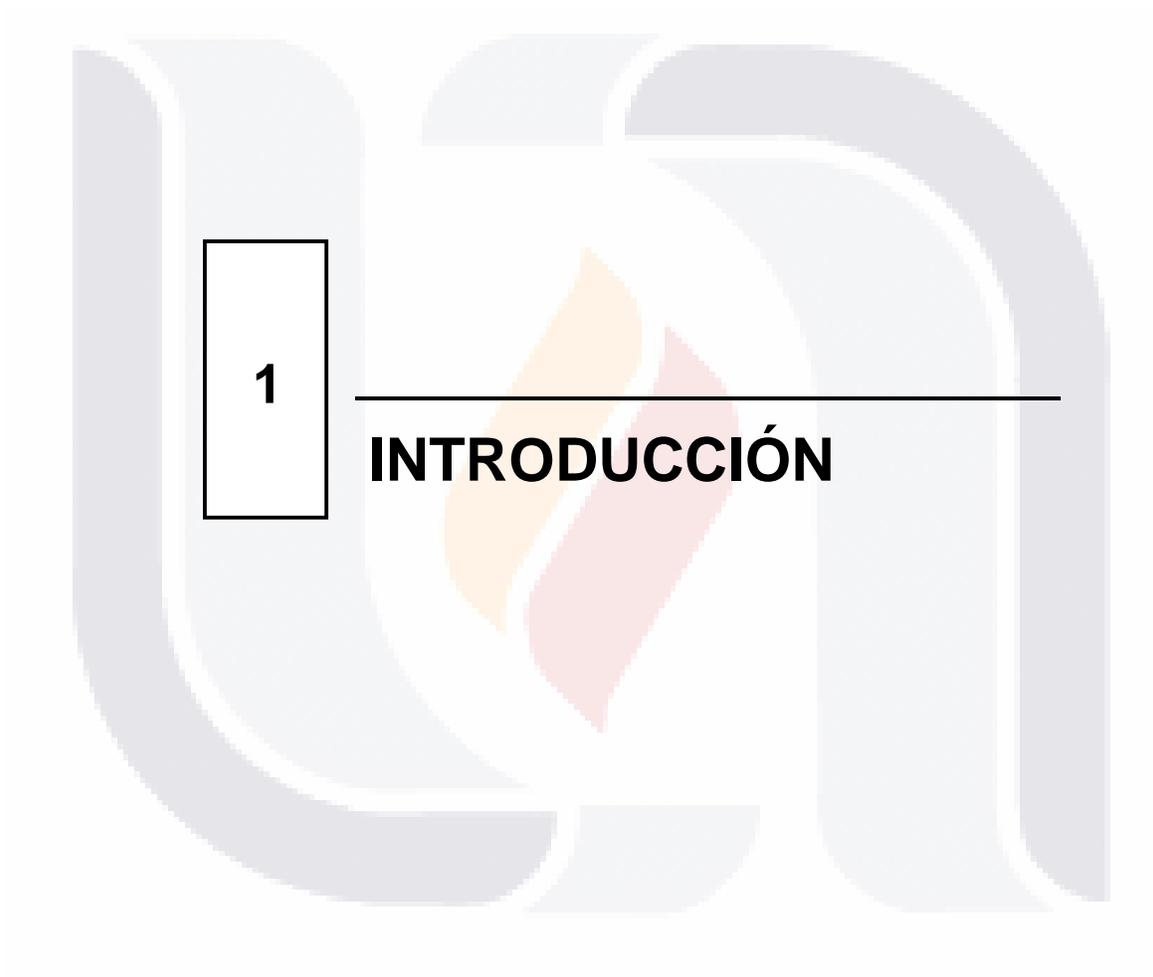
PURPOSE. To analyze the expression of GRP78 and ATF6, two actors of the unfolded protein response (UPR) in age related and diabetes associated cataracts.

DESIGN. We performed a prospective, experimental, descriptive and transversal trial.

METHODS. We measured the qualitative and quantitative expression of GRP78 and ATF6 in surgical samples, from 11 senile, 9 diabetic cataracts and three normal lentes. Both proteins were detected by immunofluorescence and immunogold conjugated antibodies. Quantitative morphometry was used to analyze differences in GRP78 and ATF6 between samples. Mann-Whitney test was used for statistical analysis.

RESULTS. Through scanning electron microscopy we found the characteristic organization of fibers in normal lenses, with regular alignment and interdigitation between them. On other hand, lenses of patients with either senile or diabetic cataracts showed the same pattern of misalignment and disorganization of the fibers. Both proteins were detected through immunofluorescence in senile and diabetic cataracts, but not normal lenses. Using immunogold conjugated antibodies and transmission electron microscopy, on diabetic cataracts, GRP78 and ATF6 grains were 30 and 35% higher, compared to senile ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS. Our data show for the first time in humans, that GRP78 and ATF6 are present in lens fibers of senile and diabetic cataracts, establishing that the unfolded protein response may be important in the process of cataractogenesis.



1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

1.1 *DIABETES MELLITUS*.

La *Diabetes mellitus* (DM), comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia. Existen varios tipos diferentes de DM debidos a una compleja interacción entre genética y factores ambientales. Dependiendo de la causa de la DM, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden ser deficiencia de la secreción de insulina, decremento del consumo de glucosa o aumento de la producción de esta (Lange; 2008). El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en diversos sistemas orgánicos, y supone una pesada carga para el individuo que padece la enfermedad (Isselbacher; 2006).

1.1.1 METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Metabolismo normal

En individuos no diabéticos con metabolismo normal, la glucosa se metaboliza enzimáticamente en el citoplasma por la vía glucolítica y por la vía de las pentosas.

Receptores de insulina.

La insulina es la principal hormona encargada de disminuir los niveles de glucosa en sangre, aumentando el transporte de glucosa al interior de las células y su conversión a glucógeno; además aumenta la oxidación del azúcar. Favorece el proceso de síntesis de lípidos y disminuye tanto la movilización de grasa de los depósitos, como su oxidación en el hígado; además, aumenta el transporte de algunos aminoácidos en las células blanco. Algunas células, como las del músculo esquelético y los adipocitos, tienen receptores específicos para la insulina y requieren dicha hormona para transportar glucosa desde el líquido intersticial hasta su citoplasma a través de la membrana celular. Cuando la insulina se une a su receptor, se generan vías de señalización intracelular, esto es, se activan sistemas que transfieren la señal de la insulina hacia el interior de la célula. Una de las vías principales de señalización es la vía del Fosfatidilinositol-3-Quinasa. El fosfatidilinositol (PTI), está presente en la membrana de las células y desempeña más que una función estructural. Ocupa una posición estratégica para servir como precursor de los segundos mensajeros, que son el inositoltrifosfato (IP3) y el

diacilglicerol (DAG). El Inositoltrifosfato (IP3) permite la liberación de calcio, importante segundo mensajero que se encuentra almacenado en el retículo endoplasmático. El diacilglicerol (DAG) permanece en el plano de la membrana aumentando la afinidad de una proteína (proteína cinasa) por el ión calcio. Así pues el IP3 actúa de forma sinérgica con el DAG para activar la proteína cinasa C (PKC) a fin de generar el reclutamiento de transportadores de la glucosa (GLUT) hacia la membrana y de este modo permitir la entrada de la glucosa en la célula. Las complicaciones microvasculares de la diabetes se relacionan con el aumento de glucosa intracelular y por eso no aparecen en los tejidos que requieren insulina para transportar glucosa dentro de sus células. Aunque se han encontrado receptores de insulina tanto en pericitos como en células endoteliales retinianas, no existe evidencia de la necesidad de dichos receptores para transportar glucosa.

Transportadores de glucosa.

Existen aproximadamente 14 tipos diferentes de transportadores para facilitar el paso de glucosa al interior de las células a través de las membranas citoplasmáticas, los cuales trabajan de manera coordinada con factores hormonales, receptores y segundos mensajeros para mantener el flujo del metabolito en condiciones normales. Los siguientes parecen ser especialmente importantes en tejidos que, como la retina, no requieren insulina

- GLUT 1. Es el más importante en la retina. Se encuentra en las células endoteliales microvasculares y macrovasculares, en las células de epitelio pigmentario de la retina y en otras células. También se encuentra en la capa de fibras nerviosas y fotorreceptores humanos.
- GLUT 2 y el GLUT 3 (Bonafonte; 2006).

1.1.2 CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS

Actualmente existen dos tipos de clasificaciones principales. La primera, correspondiente a la Organización Mundial de la Salud, que solo reconoce tres formas de DM: la tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional (que ocurre en el embarazo), cada una con diferentes causas y con distinta incidencia, y la segunda, propuesta por la Asociación Americana de Diabetes (ADA). Según el comité de expertos de la ADA, los diferentes tipos de DM se clasifican en cuatro grupos, la tipo 1, tipo 2, la gestacional y otros tipos de *Diabetes mellitus* (Lange; 2008).

Tabla1. Clasificación etiológica de la DM

Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus	
Nombre	Características
Diabetes tipo 1	Déficit absoluto de insulina Diabetes tipo 1 autoinmune: destrucción autoinmune de células beta Diabetes tipo 1 idiopática: destrucción de células beta por razones desconocidas
Diabetes tipo 2	Déficit de insulina con resistencia a la misma
Otros tipos de diabetes	Diabetes MODY Defectos genéticos de la insulina (leprecaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipoatrófica) Enfermedades del páncreas: pancreatitis, pancreatectomía, neoplasias, fibrosis quística. Endocrinopatías Infecciones
Diabetes Gestacional	Resistencia temporal a la insulina durante el embarazo

Diabetes mellitus tipo 1.

Este tipo de *diabetes* corresponde a la llamada antiguamente *Diabetes* insulino-dependiente o *diabetes* de comienzo juvenil. Se presenta mayormente en individuos jóvenes, aunque puede aparecer en cualquier etapa de la vida, y se caracteriza por la nula producción de insulina debida a la destrucción autoinmune de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas mediadas por las células T. Se suele diagnosticar antes de los 30 años de edad, y afecta a cerca de 4.9 millones de personas en todo el mundo (Isselbacher; 1994). En ausencia de insulina, los principales órganos diana (hígado, músculo y tejido adiposo) dejan de ingresar la glucosa obtenida de los alimentos y liberan aminoácidos y ácidos grasos al torrente sanguíneo. Adicionalmente, se producen alteraciones en el metabolismo del tejido graso con producción y acumulo de cuerpos cetónicos. Todas estas anomalías metabólicas desaparecen rápidamente con la administración de insulina.

La DM tipo 1 se caracteriza por una instauración aguda de los síntomas (polidipsia, poliuria, polifagia y pérdida de peso) y una tendencia a desarrollar cetoacidosis que puede ocasionar náuseas, vómitos, coma e incluso la muerte si no se trata. Los síntomas de la DM tipo 1 se originan al ocurrir la destrucción de las células beta pancreática debido a la combinación de una agresión inicial de carácter infeccioso o tóxico y un sistema inmunitario predispuesto genéticamente. Los genes implicados en el desarrollo de DM tipo 1 son los que codifican el complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) y se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6, principalmente MCH de clase II, DQ y DR (Bonafonte; 2006).

Diabetes mellitus tipo 2.

Se caracteriza por un complejo mecanismo fisiopatológico, cuyo rasgo principal es el déficit relativo de producción de insulina y una deficiente utilización periférica por los tejidos de glucosa (resistencia a la insulina), esto quiere decir que los receptores de las células que se encargan de facilitar la entrada de la insulina a la propia célula están dañados. Se desarrolla a menudo en etapas adultas de la vida, y es muy frecuente la asociación con la obesidad; anteriormente llamada *diabetes* del adulto o *diabetes* relacionada con la obesidad. Varios fármacos y otras causas pueden, sin embargo, causar este tipo de diabetes. Es muy frecuente la *diabetes* tipo 2 asociada a la toma prolongada de corticoides, frecuentemente asociada a la hemocromatosis no tratada. La *diabetes* tipo 2 representa un 90 . 95 % de todos los pacientes diabéticos (Lange; 2008).

Diabetes mellitus gestacional

La también llamada *diabetes* del embarazo aparece durante la gestación en un porcentaje de 1 a 14% de las pacientes, y casi siempre se presenta entre las semanas 24 y 28 del embarazo.

Otros tipos de diabetes mellitus

Otros tipos de *diabetes mellitus* menores (<5% de todos los casos diagnosticados)

Tipo 3A: defecto genético en las células beta

Tipo 3B: resistencia a la insulina determinada genéticamente

Tipo 3C: enfermedades del páncreas

Tipo 3D: causada por defectos hormonales

Tipo 3E: causada por compuestos químicos o fármacos (Lange; 2008).

1.1.3 CONSIDERACIONES EPIDEMIOLOGICAS

La *diabetes* afecta actualmente a más de 246 millones de personas en el mundo y se espera que alcance los 333 millones en 2025. La mayoría de los casos se presenta en países en vías de desarrollo. Se estima que en México la población de personas con *diabetes* fluctúa entre los 6.5 y 10 millones (la prevalencia nacional es de 10.7% en personas entre los 20 y 69 años). De este gran total, 2 millones de personas no han sido diagnosticadas y el 90% de personas con *diabetes* presentan el tipo 2 de la enfermedad. La prevalencia estimada de pacientes con *diabetes* tipo 2 para el año 2010 es de 150 a 220 millones. A pesar de que la *diabetes* puede ser diagnosticada fácilmente y de que existen cada vez más tratamientos disponibles para ayudar a mantener bajo control los niveles de glucosa, las complicaciones y mortalidad continúan en aumento. En México la *diabetes* es la primera causa de ceguera adquirida en edad productiva (5 de cada 100 personas con *diabetes* presentan ceguera) (www.inegi.gob.mx); el paciente diabético tiene una posibilidad 25 veces mayor de ceguera y el riesgo de desarrollar retinopatía diabética proliferativa o edema macular es mayor en los diabéticos tipo 2 (Quiroz; 2004). La diabetes también es la primera causa de insuficiencia renal crónica y de amputaciones no traumáticas de miembros inferiores (www.inegi.gob.mx).

1.2 COMPLICACIONES CRONICAS DE LA *Diabetes mellitus*

Las manifestaciones clínicas tardías de la *diabetes* incluyen diversos cambios patológicos que afectan a los vasos pequeños y grandes, nervios periféricos y craneales, piel y cristalino. Tales lesiones conducen a hipertensión, insuficiencia renal, ceguera, neuropatía autónoma y periférica, amputaciones de extremidades inferiores, infarto miocárdico y accidentes vasculares cerebrales.

1.2.1 COMPLICACIONES OCULARES

A. Cataratas diabéticas.

Las cataratas son la opacidad del cristalino que ocasiona una disminución de la agudeza visual. Los pacientes diabéticos desarrollan cataratas prematuras que parecen relacionarse con la duración de la enfermedad y la gravedad de la hiperglucemia crónica. Aparecen en un 25% de los diabéticos tipo 1 y 85% de los diabéticos tipo 2. La glucosilación no enzimática de la proteína del cristalino es de dos veces mayor en diabéticos que en personas no diabéticas de edad similar, lo cual contribuye a la formación prematura de cataratas (Lange; 2008).

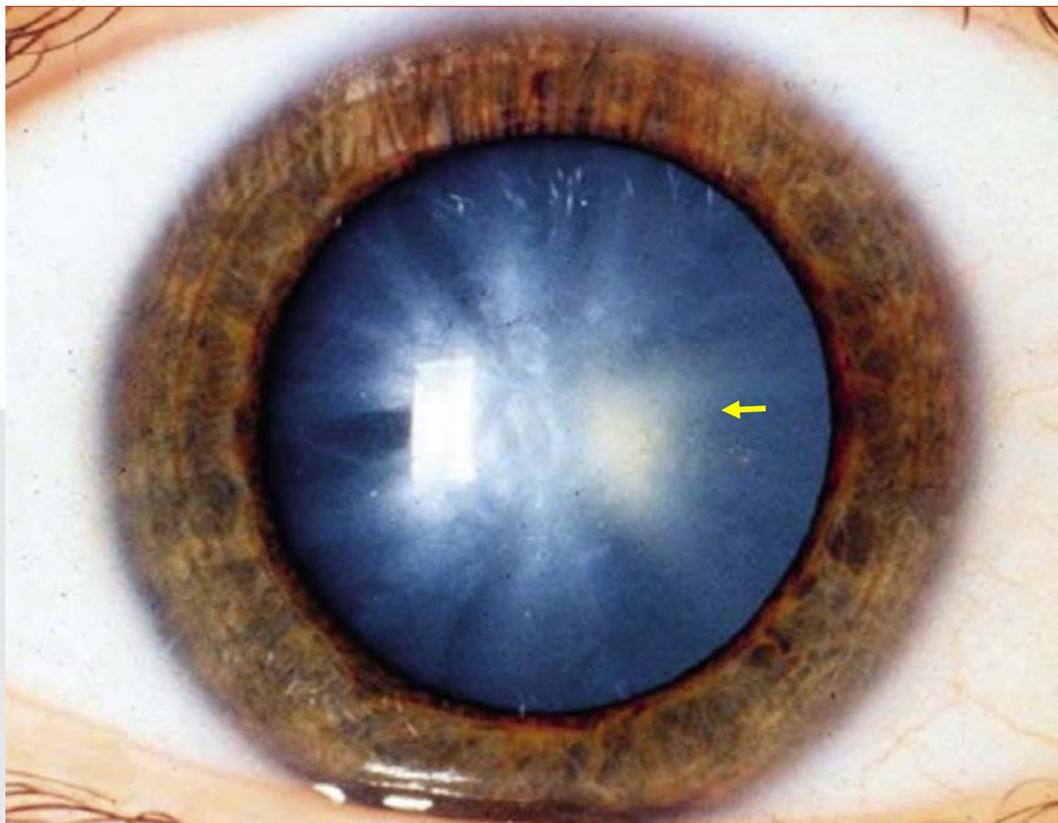


Figura 1. Aparición de catarata en mujer de 45 años de edad con *Diabetes mellitus*, mostrando la típica opacidad en la corteza anterior y posterior (Levin; 2010).

B. Retinopatía diabética.

Es una complicación de la microvasculatura retiniana que ocasiona disfunción progresiva de la misma y que es causada por un estado de hiperglicemia crónica. Es la complicación más frecuente de la D.M crónica y ha tenido un importante aumento en los últimos años hasta convertirse en la causa principal de deficiencia visual y ceguera en adultos entre los 20 a 74 años de edad en países industrializados. Cada año se quedan ciegos 10,000 personas diabéticas (Isselbacher, 2006). El tiempo de evolución de la diabetes constituye un factor primordial en la aparición y progresión de la retinopatía diabética; el 90% de los sujetos presenta algún tipo de retinopatía diabética después de 20 años del diagnóstico; en el caso de los de tipo 1 la retinopatía diabética no proliferativa ocurre en 18% de las personas con menos de cinco años de evolución, 71% en las que tienen 10 años de diagnóstico y 42% en las de más de 40 años. Respecto de

la forma proliferativa, se observa en un 4% en pacientes con 10 años de evolución, 57% en los de 30 años y 67% en los que tienen más de 35 años (Quiroz; 2004).

Existen tres principales estadios de la enfermedad

- Sin retinopatía diabética
- Retinopatía diabética No Proliferativa (RDNP), la cual representa los primeros estadios clínicos con microaneurismas, hemorragias intrarretinianas y exudados blandos. Al progresar se producen oclusiones graduales de los vasos retinianos con áreas de mala perfusión e isquemia retiniana cuyos signos incluyen el aumento de las hemorragias intrarretinianas, anomalías venosas y anomalías microvasculares intrarretinianas (AMIR).
- Retinopatía diabética proliferativa (RDP). Representa los estadios clínicos más graves. Se caracteriza por la aparición de neovasos en la superficie interna de la retina. La neovascularización puede aparecer en la papila o disco óptico (NVD) o en cualquier parte de la retina, es decir, extracapilar (NVE). Los neovasos sangran con facilidad produciendo hemorragias intravítreas y pueden presentar fibrosis y contracción. Las proliferaciones fibrosas de cualquier origen producen membranas epirretinianas, desgarros de retina y desprendimiento de retina. Cuando los vasos ocupan más del 25% del área papilar aumenta la probabilidad de pérdida visual grave.

Los pacientes jóvenes con DM tipo 1 tienen la mayor incidencia de progresión rápida hacia la RD proliferativa y los tipo 2 hacia el edema macular. La RD no proliferativa es más frecuente, 80% contra 20% de la proliferativa (Quiroz; 2004).

1.3 CRISTALINO

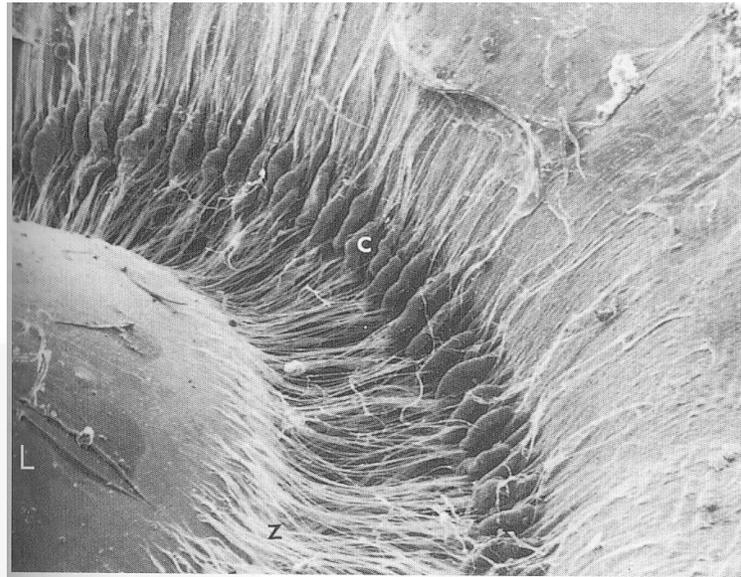


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de la superficie posterior del cristalino. C, cuerpo ciliar; L; cristalino; Z, fibras de las zónula (Gartner; 2008).

1.3.1 Anatomía y Fisiología del Cristalino

El cristalino es una lente biconvexa que se encuentra situada por detrás del iris y por delante del vítreo tiene poder de convergencia variable (aproximadamente +22 dioptrías) dependiendo de la tracción que ejerzan las fibras zonulares sobre su ecuador (Bobrow; 2008).

En su estructura se distinguen:

- a. La *cápsula o cristaloides*, que es una fina membrana elástica y semipermeable que envuelve totalmente al cristalino (Kaufman y Alm; 2004). Contiene en particular colágena IV y glicoproteína que recubre las células epiteliales (Gartner; 2008). La cápsula anterior es la membrana basal del epitelio anterior del cristalino; (Figura 2) es la *membrana basal más gruesa del organismo* (Kaufman y Alm; 2004).

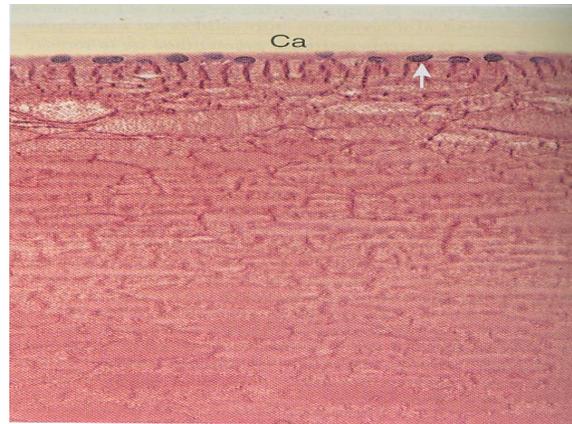


Figura 3. Corte histológico del cristalino. Se observa la cápsula (C), epitelio subcapsular posterior (E) y las fibras cristalinas (F) (Gartner; 2008).

b. El *epitelio subcapsular*, solo se halla en la superficie anterior del cristalino, en un plano inmediatamente profundo respecto de la cápsula de éste (Gartner; 2008); Se conforma por una sola capa de fibras cúbicas germinativas que originan fibras que se van sumando a las subyacentes durante toda la vida (Vaughan, Asbury and Riordan-Eva; 1994).

c. Las *fibras del cristalino*, componen la mayor parte del cristalino, y son unas 2000 células largas, que se encuentran debajo del epitelio subcapsular y la cápsula del cristalino. Las células del epitelio subcapsular dan origen a estas células hexagonales, altamente diferenciadas, las fibras del cristalino, que pierden su núcleo y organelos y no dejan de alargarse hasta que alcanzan una longitud de 7 a 10 micrómetros. Este proceso de alargamiento que se conoce como maduración, prosigue durante toda la vida de la persona. Al final, estas células hexagonales largas se llenan con *crystalinas*, que son proteínas del cristalino cuya presencia incrementa el índice de refracción de las fibras del cristalino (Gartner; 2008).

d. La *zónula*, o *ligamento suspensorio*, se extiende desde los procesos ciliares al ecuador del cristalino, manteniéndolo en su lugar y transmitiéndole las contracciones del músculo ciliar. Con la edad disminuyen en número y resistencia (Vaughan, Asbury and Riordan-Eva; 1994)

El *cristalino* es *avascular* y *no posee inervación*. Las proteínas que lo integran, solubles en niños y jóvenes, se van transformando en insolubles en el adulto, lo que le resta elasticidad y transparencia. El cristalino forma nuevas fibras a lo largo de toda la vida. En los seres humanos las fibras viejas se comprimen centralmente

para formar un núcleo cristalino inelástico cada vez mayor (Kaufman y Alm; 2004).

La principal función es la acomodación. Cuando el músculo ciliar se contrae (fibras circulares), relaja las fibras zonulares, y el cristalino tiende a hacerse más convexo (especialmente la zona anterior central de la cápsula, el radio de curvatura anterior cambia de 10 a 6 mm.) y de esta forma aumenta su potencia. En la acomodación hay que incluir dos procesos paralelos: la convergencia (para la fusión de las imágenes retinianas) y la miosis (que disminuye las aberraciones de los cambios de curvatura del cristalino). Estos tres fenómenos están modulados por el parasimpático. Mediante la acomodación podemos conseguir focalizar en la retina los objetos situados entre el *punto remoto* (punto más lejano que se ve nítido) y el *punto próximo* (punto más cercano que se ve nítido). La amplitud de acomodación va disminuyendo con la edad a medida que el cristalino se va endureciendo y va apareciendo la presbicia, que es la disminución de la capacidad del enfoque del ojo, lo cual trae como consecuencia que exista dificultad para ver nítidamente los objetos cercanos (Vaughan, Asbury and Riordan-Eva; 1994).

1.3.2 Proteínas cristalinas

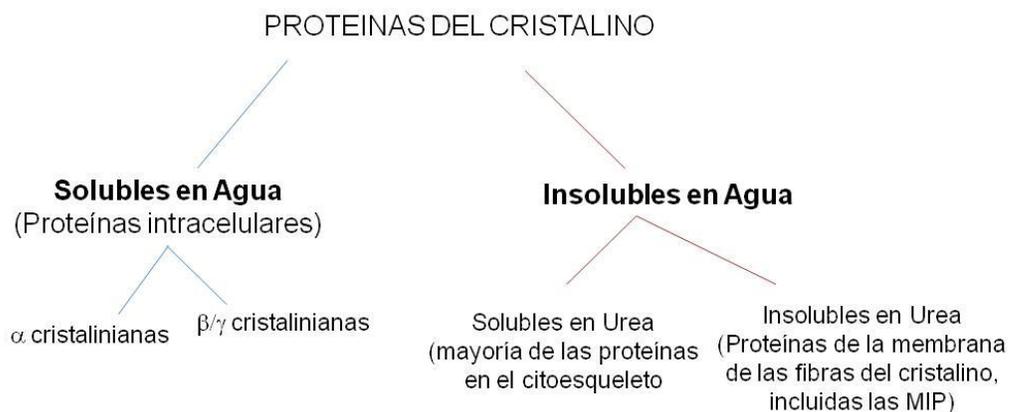


Figura 4. Descripción de las proteínas del cristalino (Bobrow; 2008).

El proceso de diferenciación de las células del cristalino para convertirse en fibras del cristalino, se caracteriza por la síntesis y acumulación de proteínas cristalinas. Las cristalinianas constituyen hasta el 40% del peso húmedo de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fibras del cristalino, lo que representa una concentración proteica alrededor de tres veces mayor de la existente en el citoplasma de células típicas (Kaufman y Alm; 2004). Las proteínas lenticulares suelen agruparse en dos categorías según su solubilidad en agua. La fracción hidrosoluble del cristalino joven da cuenta del 80% de las proteínas lenticulares y se componen sobre todo de un grupo de proteínas llamadas CRISTALINIANAS. Las cristaliniánas se han subdividido en dos grandes grupos: alfa (α) y betagamma (β/γ).

Las cristaliniánas alfa representan en términos de masa, un tercio de todas las proteínas lenticulares. En su estado nativo, son las cristaliniánas más grandes, con un peso molecular aproximado de 600 kDa. Sin embargo, pueden unirse a otras proteínas cristalinas y formar complejos de hasta 2 mega daltones. Hay dos subunidades de cristalinas alfaA y alfaB, que constituyen complejos heterodiméricos. Los complejos de proteínas alfa se unen a proteínas parcialmente desnaturalizadas que impiden su agregación, de tal manera que la función principal de los complejos de proteínas alfa en las fibras del cristalino parece ser evitar la desnaturalización completa y la insolubilización de las otras cristaliniánas.

Las cristalinas beta/gamma se dividen en dos grupos según el peso molecular y el punto isoeléctrico. Las cristalinas beta dan cuenta del 55% de las proteínas hidrosolubles del cristalino y están codificadas por siete genes. Las cristalinas gamma son las más pequeñas y su peso molecular se sitúa en torno a los 20 kDa o menos. Las cristalinas gamma nativas no se asocian entre sí ni con ninguna otra proteína, por lo que muestran el peso molecular más bajo de las fracciones cristaliniánas. Contienen aproximadamente el 15% de las proteínas del cristalino en los mamíferos adultos. La familia gamma humana esta codificada por cuatro genes (Bobrow; 2008).

Proteínas estructurales de la membrana y proteínas citoesqueléticas

La fracción no hidrosoluble de las proteínas del cristalino se puede subdividir en dos fracciones, una soluble en urea de 8 M y otra insoluble. La fracción soluble en urea del cristalino joven contiene proteínas citoesqueléticas que proporcionan el armazón estructural a las células del cristalino. Los microfilamentos y los microtúbulos hallados en las células lenticulares se asemejan a las de otros tipos de células, si bien el cristalino contiene dos tipos de filamentos inusuales: una categoría consta de la proteína vimentina, no suele encontrarse en células epiteliales, y la otra, los filamentos arrosariados, la constituyen las proteínas faquinina y filensina, específicas del cristalino. La desestructuración genéticas de

los filamentos arrosariados determinan una alteración en la estructura de las células fibrosas y la formación de cataratas.

La fracción insoluble en urea del cristalino joven contiene las membranas citoplasmáticas de las células (fibras) del cristalino. Varias proteínas se asocian a estas membranas citoplasmáticas de las células fibrosas. Una de ellas compone casi la mitad de las proteínas membranales y se han denominado proteína intrínseca mayor (MIP). La MIP aparece primero en el cristalino, en el momento en que las fibras empiezan a elongarse. Con el paso del tiempo, esta proteína, que posee un peso molecular de 28 kDa, experimenta una escisión proteolítica segregando un fragmento proteico de 22 kDa. Los porcentajes relativos de estas dos proteínas se equiparan hacia los 20 . 30 años de edad. Como es de esperar, en el núcleo predomina la proteína de 22 kDa (Bobrow; 2008).

1.3.3 Bioquímica del cristalino

Como resultado de la ausencia de vascularización sanguínea, la concentración de oxígeno en el interior y alrededor del cristalino es mucho menor que la que existe en casi todas las demás estructuras del cuerpo. Por lo tanto, el cristalino depende del metabolismo glucolítico para producir la mayor parte del ATP y de los equivalentes de reducción necesarios para su actividad metabólica. La glucosa necesaria para el metabolismo glucolítico procede del humor acuoso, donde los niveles de glucosa se mantienen mediante difusión facilitada a través del epitelio ciliar. Sin embargo, las células epiteliales y las fibras superficiales del cristalino también contienen numerosas mitocondrias. Por tanto, las células cercanas a la superficie del cristalino pueden utilizar la vía glucolítica y oxidativa para producir energía a partir de la glucosa (Figura 3) (Kaufman y Alm, 2004). Las reacciones del cristalino que ayudan a mantener su integridad estructural y funcional son la ATPasa Na^+ , K^+ para el equilibrio osmótico, la glutatión reductasa para el equilibrio del estado redox, y la síntesis proteica para el crecimiento y el mantenimiento. Aproximadamente el 85% de la glucosa metabolizada por el cristalino lo hace a través de la glucólisis, el 10% por la ruta de la hexosa monofosfato y el 5% por el ciclo de Krebs (Devlin, 2000).

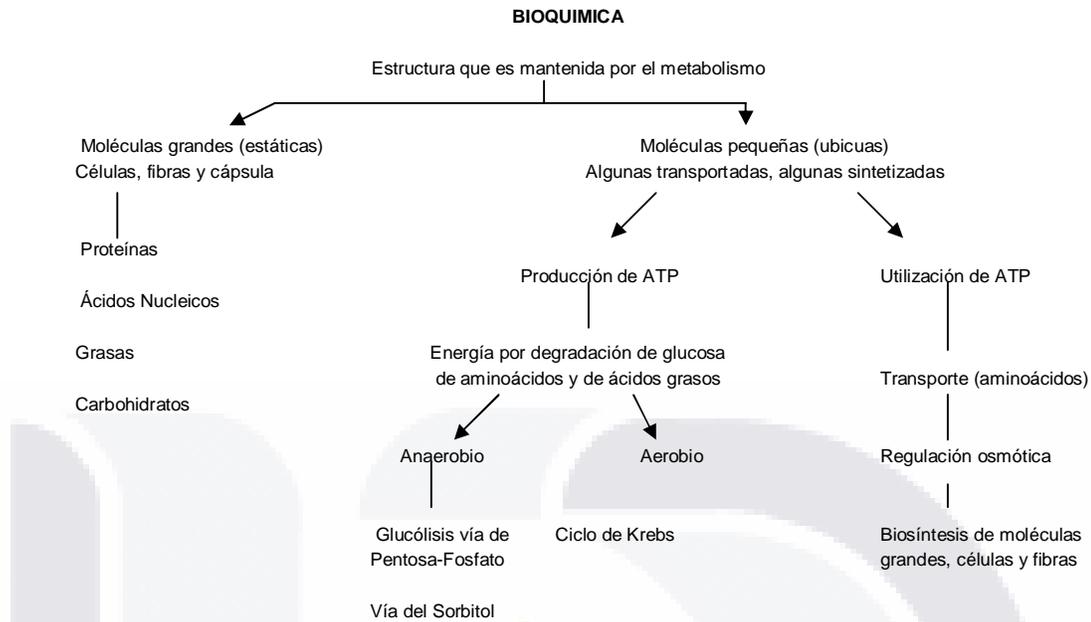


Figura 5. División esquemática de la bioquímica del cristalino en pequeñas y grandes moléculas (Perkins y Hill; 1980).

1.3.4 Glutación y Ácido Ascórbico como mecanismos protectores del Estrés Oxidativo en el Cristalino.

Como la tensión del oxígeno dentro y alrededor del cristalino suele ser baja; en las reacciones de los radicales libres podría no intervenir el oxígeno molecular; los radicales libres reaccionarían directamente con las moléculas. El ADN se daña fácilmente por los radicales libres; una parte del daño al cristalino es reparable y otra tiene carácter de permanente. Además los radicales libres pueden atacar las proteínas o los lípidos de la membrana de la corteza. No se conoce ningún mecanismo reparador de este daño, que se incrementa con el tiempo. El daño por radicales libres de las fibras del cristalino, en las que ya no tiene lugar la síntesis de proteínas, determina una polimerización y entrecruzamiento de lípidos y proteínas que acaba elevando el contenido de proteínas no hidrosolubles (Bobrow; 2008).

En el cristalino se presentan cantidades importantes de glutación que puede formar enlaces disulfuros con los grupos sulfhidrilos oxidados de las proteínas. Estos enlaces disulfuros mixtos glutación-proteína pueden ser reducidos más tarde por una molécula de glutación, un proceso facilitado por la enzima tioltransferasa. Este proceso da lugar a la regeneración del sulfhidrilo proteico y permite la

formación de glutatión con enlace disulfuro (GSSG), que más tarde se difunde hacia las capas más superficiales del cristalino, donde puede reducirse para formar dos moléculas de glutatión. Es probable que esta difusión bidireccional represente el paso limitante en la velocidad de mantenimiento de un ambiente reducido en el centro del cristalino. Por lo tanto, las proteínas y los lípidos de los núcleos de los cristalinos de las personas de edad avanzada tienen menos capacidad de soportar la sobrecarga oxidativa que los cristalinos de personas más jóvenes.

Es posible que el ácido ascórbico proteja también al cristalino frente a la lesión oxidativa. El ácido ascórbico es transportado de manera activa desde la sangre hasta el humor acuoso mediante un sistema transportador dependiente de sodio que se localiza en el epitelio ciliar, de manera que alcanza concentraciones en el humor acuoso hasta 20 veces mayores que las que existen en la sangre. Los niveles de ácido ascórbico en el cristalino y en otros tejidos oculares también son importantes, aunque los datos existentes a este respecto indican que el cristalino no contiene un sistema transportador de ácido ascórbico dependiente del sodio. El dehidroascorbato es la forma oxidada del ácido ascórbico y puede alcanzar el cristalino a través del sistema transportador de la glucosa, de manera que puede reducirse mediante los procesos dependientes del glutatión. Al igual que este, el ascorbato se oxida fácilmente formando ácido dehidroascorbico. Por tanto, el ácido ascórbico puede reaccionar con radicales libres y con otros oxidantes en el humor acuoso y en el cristalino impidiendo que dañen los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos del cristalino.

Además, de la presencia de transferrina en el humor acuoso, que puede minimizar los efectos perjudiciales del peróxido de hidrógeno, el cristalino presenta dos sistemas enzimáticos para la detoxificación de este metabolito. Las células epiteliales del cristalino presentan niveles abundantes de catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua, y de glutatión peroxidasa, enzima que acopla la reducción del peróxido de hidrógeno a la oxidación del glutatión (Kaufman y Alm; 2004).

1.4. MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS COMPLICACIONES OCULARES.

1.4.1 CATARATAS.

A medida que envejece el cristalino, aumenta de peso y de grosor y disminuye su poder de acomodación. Según se van formando nuevas capas concéntricas de fibras corticales, el núcleo cristalino experimenta una compresión y endurecimiento (esclerosis nuclear). La modificación química y la descomposición

proteolítica de las cristalinas (proteínas del cristalino) dan lugar a la formación de agregados proteínicos de alto peso molecular que alcanzan un tamaño suficiente como para ocasionar fluctuaciones bruscas del índice refractivo local del cristalino dispersando la luz y disminuyendo la transparencia de este. La modificación química de las proteínas nucleares del cristalino también aumenta la pigmentación, después de que el cristalino adopte un tono amarillo pardusco con el paso del tiempo (Bobrow; 2008) (Rosenberg; 2008).

Cambios bioquímicos.

Las cataratas por diabetes mellitus se dan por una pérdida de osmolaridad del cristalino debida a la actividad de la aldosa reductasa y la poliol deshidrogenasa de la ruta metabólica del poliol. Cuando la concentración de la glucosa en el cristalino es elevada, la aldosa reductasa reduce una parte de aquella hasta sorbitol. El sorbitol puede convertirse en fructuosa mediante la poliol deshidrogenasa. En el cristalino humano, la relación entre las actividades de estas dos enzimas favorece la acumulación de sorbitol, especialmente porque el sorbitol no se utiliza de otro modo y difunde fuera del cristalino muy lentamente. Con el tiempo, la acumulación de sorbitol en el cristalino conduce a un aumento de la osmolaridad del mismo. Este cambio en la osmolaridad afecta a la organización estructural de las proteínas cristalinas del interior de las células del cristalino y estimula su velocidad de agregación y desnaturalización. Las áreas en las que se produce este fenómeno presentan un aumento en la dispersión de la luz, que es la definición de catarata (Devlin, 2000).

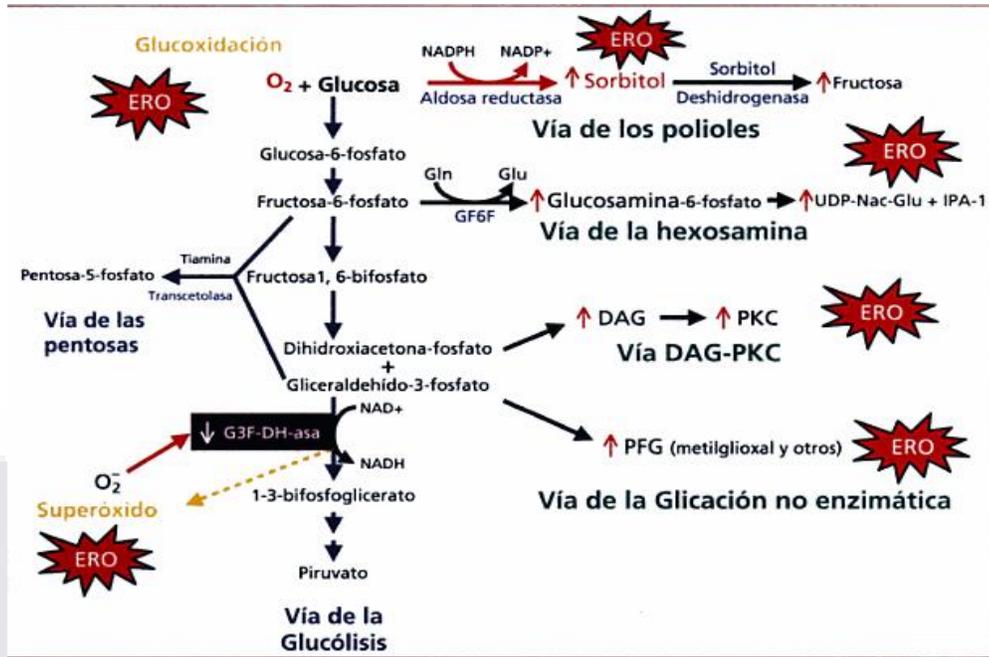


Figura 6. Principales vías metabólicas en la hiperglucemia. Si la glucemia es normal, la glucosa se metaboliza por la vía glucolítica y de las pentosas. En la hiperglucemia se saturan las citadas vías y la glucosa activa cuatro vías alternativas (vía de los polioles, vía de las hexosaminas, vía de la PKC y vía de la glicación no enzimática). Todas las citadas vías producen ERO (especies reactivas de oxígeno) en la cadena respiratoria mitocondrial. El superóxido inhibe la G3F-DH-asa (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y aumenta los metabolitos iniciales de las principales vías (Bonafonte y García; 2006).

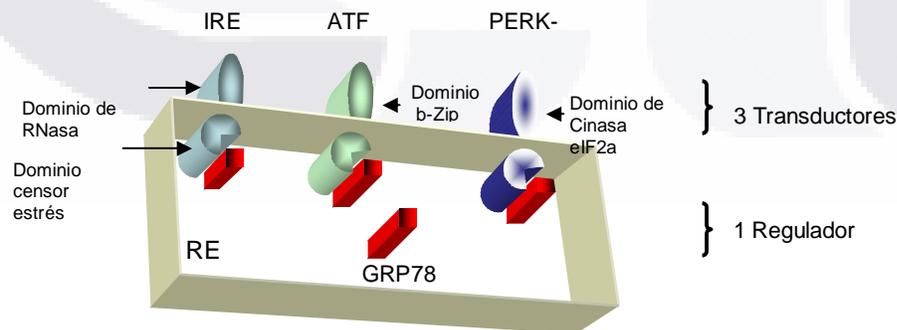
1.5 RESPUESTA A LAS PROTEINAS MAL CONFORMADAS.

Diversas situaciones que culminan en un estrés celular, en condiciones extracelulares del micro ambiente tales como cambios en el pH, la isquemia o la privación de nutrientes, o condiciones intracelulares como el acumulo de materiales mal procesados en el RE en las enfermedades conformacionales, son capaces de inducir una respuesta adaptativa de la célula conocida como la respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC) (Lee 2001).

La RPMC es esencial para mantener la homeostasis celular participando en eventos como la regulación de la secreción de insulina, el estado de diferenciación de una célula con la finalidad de adaptarla a sus reservas de nutrientes o energía logrando que sobreviva en condiciones precarias o preparándola para la producción de grandes cantidades de productos secretorios como hormonas, anticuerpos o factores de crecimiento (Yuan and Glazer 1998; Kaufman, Scheuner et al. 2002). Sin embargo, muchos aspectos de esta respuesta son citoprotectores, y diversos

estudios indican que su activación puede ser crucial en el crecimiento tumoral, aunque hasta el momento no se ha determinado el mecanismo por el cual sucede lo anterior (Ma and Hendershot 2004; Zhang and Kaufman 2004).

Los componentes básicos de esta respuesta son los transductores Ire1, ATF6 y PERK, así como el regulador maestro conocido como BiP/GRP78 (Figura 5). El primer transductor identificado fue la proteína transmembranal cinasa/endoribonucleasa Ire1, la cual tiene dos isoformas en los mamíferos: IRE1 α e IRE1 β . El primero, se expresa en todas las células del organismo, mientras que el segundo presenta una expresión restringida a las células epiteliales del tracto gastrointestinal. Esta proteína presenta un dominio N terminal censor del estrés del RE dentro del lumen de este organelo, un dominio transmembranal del RE, un dominio de cinasa de residuos de serina/treonina y por último un dominio C terminal con actividad de endoribonucleasa en el citosol. El transductor ATF6 es un factor de transcripción con un dominio N terminal b-ZIP (del inglés basic leucine zipper) en el citosol y un dominio C terminal sensor del estrés dentro del RE. Por último, la proteína cinasa similar a la cinasa del RE activada por RNA de doble cadena, PERK (del inglés double-stranded RNA activated Protein kinasa-like ER Kinase), contiene un dominio censor del estrés del RE dentro del mismo y un dominio citosólico que fosforila la subunidad α del factor 2 iniciador de traducción en eucariontes (eIF2 α). El regulador maestro es la proteína chaperona del RE, GRP78 que en condiciones de no-estrés se une e inactiva a los tres transductores, manteniéndolos dentro del RE (Zhang and Kaufman 2004).

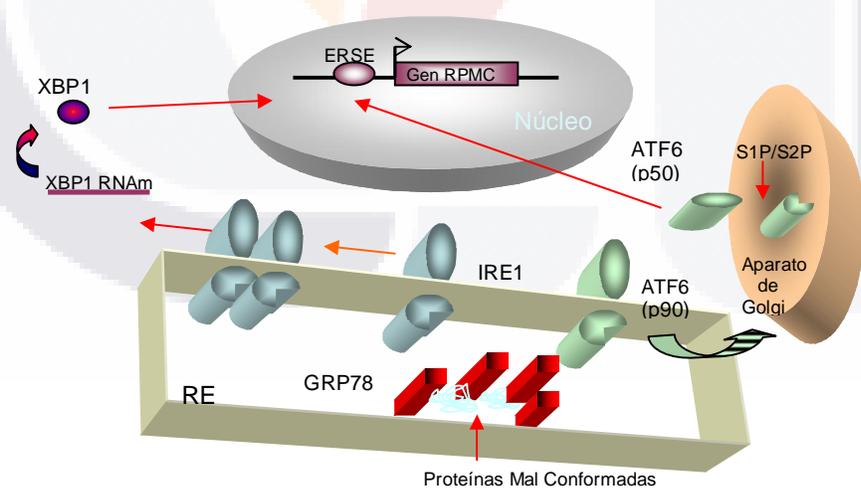


Zhang, K. and R. J. Kaufman (2004). *J Biol Chem* 279(25): 25935-8.
 Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). *Nat Rev Cancer* 4(12): 966-77.

Figura 7. Esquema de componentes básicos de la Respuesta a Proteínas mal conformadas.

Ante la acumulación de proteínas mal conformadas en el RE por diversos estímulos que convergen en estrés celular, se activa la RPMC. Esta presenta dos brazos principales.

El primer brazo (Figura 6) comienza cuando el acumulo de proteínas mal conformadas atrae a GRP78, desligándolo de los transductores de la RPMC. Así pues, la homo-dimerización y trans-auto fosforilación del IRE1 activa su función de endoribonucleasa, procesando el RNAm del factor de transcripción XBP1, el cual mediante un empalme alternativo remueve un intrón de 26 nucleótidos, promoviendo la traducción de un RNAm modificado que codifica para una proteína con un nuevo dominio C terminal que actúa como un potente activador de la transcripción de diversos genes de la RPMC que comparten en su promotor la secuencia consenso conocida como ERSE (del inglés ER Stress response Element) (Yoshida, Haze et al. 1998; Ubeda and Habener 2000; Yan, Frank et al. 2002). Por otra parte, ATF6 responde al acumulo de proteínas mal conformadas transportándose al Golgi donde las proteasas del sitio 1 y 2 (S1P y S2P) lo procesan para generar un fragmento citosólico que contiene el dominio b-ZIP, el cual migra al núcleo y potencia la función de XBP1 al unirse al ERSE de los genes de la RPMC, situándose en vías paralelas e interactuando con los otros transductores de esta respuesta. Todo lo anterior conlleva a la transcripción de diversas chaperonas y proteínas cuya función trata de mantener la homeostasis del RE.



Zhang, K. and R. J. Kaufman (2004). *J Biol Chem* 279(25): 25935-8.
 Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). *Nat Rev Cancer* 4(12): 966-77.

Figura 8. Primer brazo de la respuesta a proteínas mal conformadas.

El segundo brazo de la RPMC consiste en la activación de PERK el cual promueve la fosforilación de eIF2 α , la cual promueve a su vez el paro del ciclo celular a través de la inhibición de Ciclina D1 (Brewer, Hendershot et al. 1999; Brewer and Diehl 2000) y además promueve la traducción selectiva del RNAm del ATF4, el cual activa de forma subsecuente la transcripción de diversos genes como GRP78 y CHOP (Figura 7) (Zhang and Kaufman 2004).

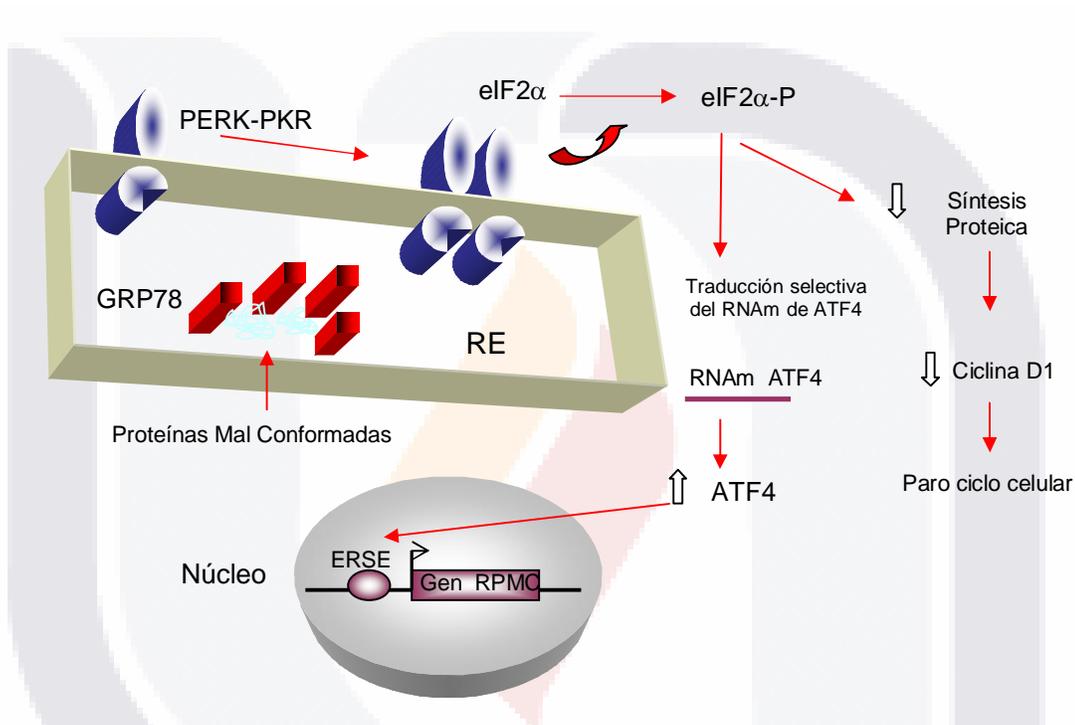


Figura 9. Segundo brazo de la respuesta a proteínas mal conformadas.

Estudios anteriores revelan la sobre expresión de 5 proteínas que protagonizan la respuesta celular específica conocida como la respuesta a proteínas mal conformadas (RPMC) como delección de ciertos genes en neoplasias gástricas. Estas proteínas son:

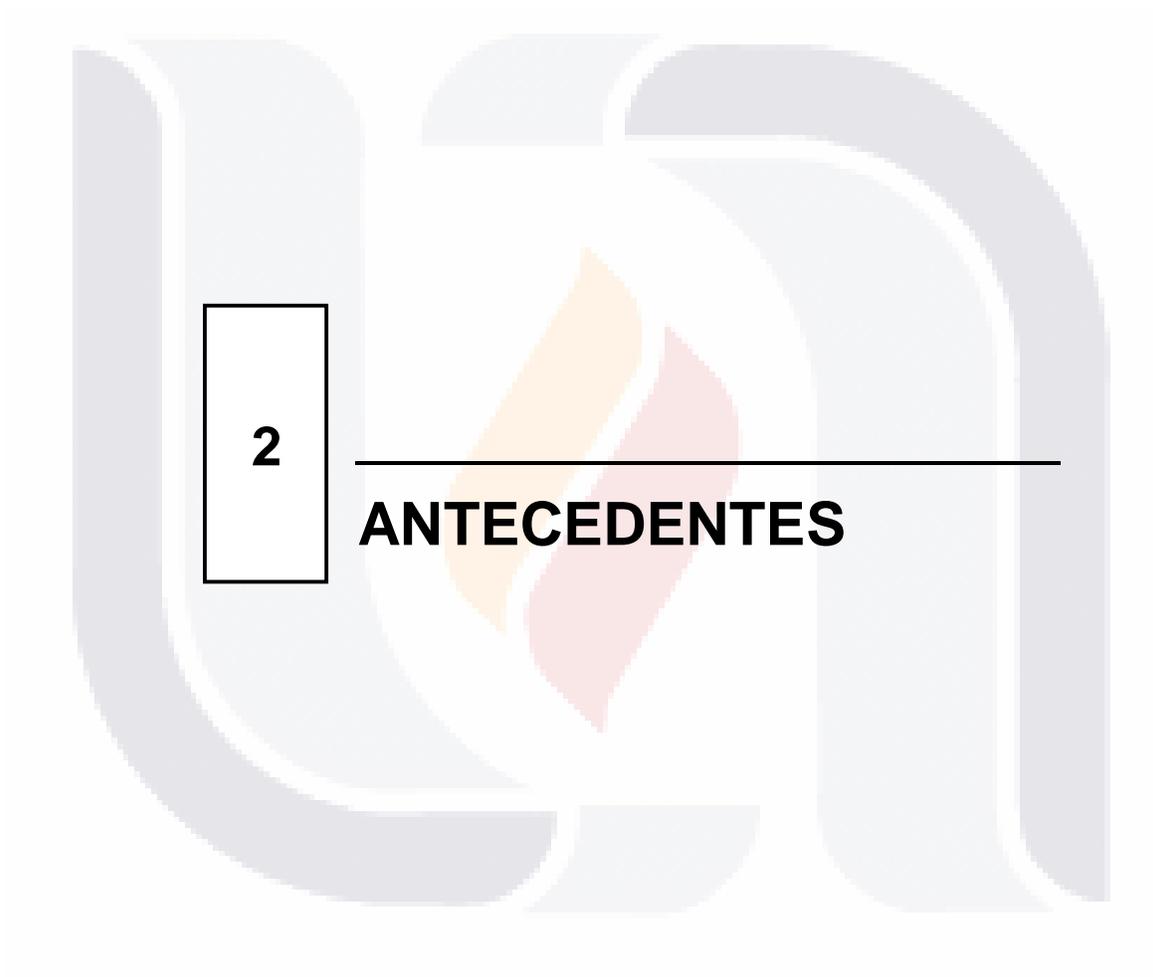
- BiP/GRP78 que es un miembro de la familia de las proteínas chaperonas HSP70, cuya función principal es la de unirse permanentemente a proteínas mal conformadas, mal procesadas o mal ensambladas cuya secreción extracelular está bloqueada (Gething and Sambrook 1992). También tiene un papel esencial en el transporte de polipéptidos aberrantes destinados a la degradación del proteosoma. Además, presenta una función anti-apoptótica en condiciones de estrés, protegiendo la célula contra la apoptosis inducida por el

estrés del RE formando complejos e inhibiendo las caspasas 7 y 12 (Rao, Peel et al. 2002) en condiciones tales como el crecimiento tumoral (Jamora, Dennert et al. 1996).

- Erp72 es una proteína disulfuro-isomerasa, cuyo objetivo es el de promover el procesamiento adecuado de las proteínas dentro del retículo endoplásmico de manera secuencial o simultánea con GRP78 formando complejos que catalizan la maduración conformacional de proteínas a secretar. La sobre-expresión de estas dos proteínas constituye un sine-qua-non de la RPMC, dado que en el promotor de los genes que codifican estas proteínas se identifica el elemento de respuesta del RE conocido como ERSE (por sus siglas en inglés Endoplasmic Reticulum Stress Response Element) el cual es estimulado vía transcripcional de forma paralela ante el estrés del RE (Parker, Phan et al. 2001; Yoshida, Okada et al. 2001).
- Un tercer miembro de esta vía de señalización también fue sobre-expresado, p58IPK, proteína co-chaperona de la familia Hsp40, la cual también ha demostrado tener un potencial oncogénico mediante su función anti-apoptótica, protegiendo las células contra la apoptosis inducida por TNF- α y dsRNA (Melville, Katze et al. 2000), teniendo un doble mecanismo: 1) PKR dependiente, siendo su sobre-expresión un inhibidor de PKR, y PERK, ambas cinasas que interactúan con el factor de traducción eIF2 α el cual normalmente produce la pérdida de ciclina D1, produciendo el paro del ciclo celular que normalmente acompaña la RPMC (Brewer and Diehl 2000; Campo, Das et al. 2002). Un segundo mecanismo de oncogénesis sería el que su dominio J interactuara con Hsp70 para que este a su vez inactivara una proteína supresora de tumor ya sea la misma PKR u otro (Melville, Katz et al. 2000). Tanto GRP78/BiP como p58IPK han demostrado poseer un potencial oncogénico de importancia (Jamora, Dennert et al. 2000).
- Otro de los componentes de la vía apoptótica mediada por el estrés del RE, es el gen CHOP, que codifica para una proteína homóloga C/EBP, también conocida como el gen 153 inducido por daño al DNA (GADD153) (Oyadomari and Mori 2004). La expresión de este gen se realiza en forma paralela a la de las chaperonas GRP78 Y Erp72 en condiciones de estrés celular (Flores-Díaz, Higueta et al. 2004). (Wang, Lawson et al. 1996) mediante la activación del efector Ire1, el cual es a su vez activado por el estrés del RE en presencia del acumulo de proteínas mal conformadas (Wang, Harding et al. 1998).
- Finalmente, se encuentra la clusterina. Esta es una proteína sintetizada por las células epiteliales de diversos órganos cuya función no se encuentra bien

establecida. La expresión de esta proteína también llamada TRPM2 (testosterone, repressed protate Messenger 2) DAG (dimeric acidic glycoprotein), apolipoproteína J o glicoproteína sulfatada 2, se ha correlacionado con la estabilización de proteínas en un estado de plegamiento competente en condiciones de estrés celular, fenómenos de reparación tisular, apoptosis axial como durante el desarrollo y progresión de diversos tumores. Recientemente se le ha reconocido como un marcador biológico del cáncer en el aparato gastrointestinal.





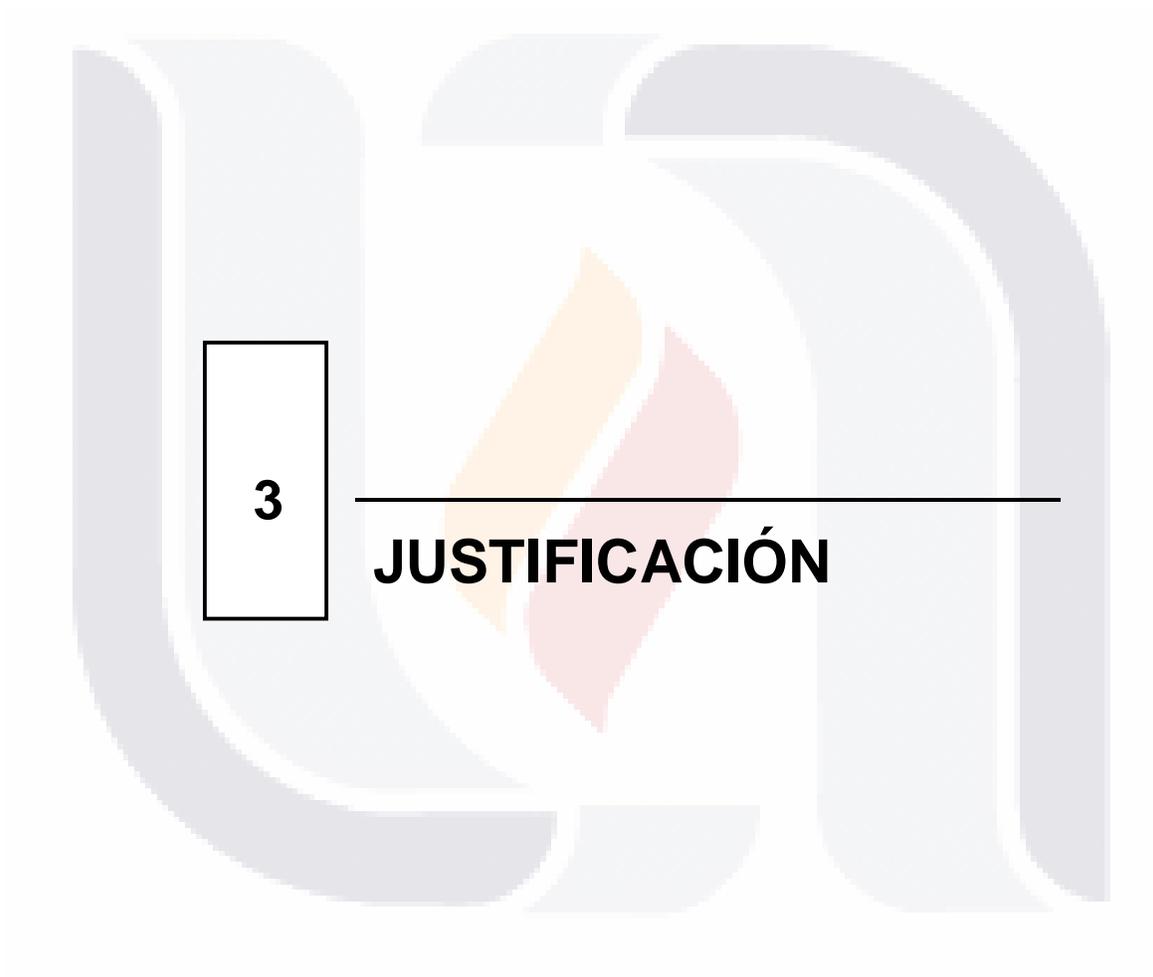
2

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

Los antecedentes más recientes encontrados en relación con este proyecto fueron los siguientes:

1. Mulhern et al. en el artículo publicado en 2006 asociaron en tejidos oculares de ratas galactosémicas con cataratas, la glucosilación no enzimática de proteínas, estrés osmótico y el estrés oxidativo. Pues encontraron que el estrés osmótico y oxidativo en las células epiteliales del cristalino induce la RPMC, la cual jugaba un importante papel en el daño a las células epiteliales del cristalino durante el desarrollo de las cataratas diabéticas.
2. En Octubre de 2009 Fitina Z., Danysh *et al.* encontraron evidencia in vivo de un posible papel de la RPMC en la formación de cataratas, ya que al trabajar con ratones transgénicos que expresaron genes Col4a3 en el cristalino como modelo experimental demostraron que
 - a. Activación y sobre expresión de los transductores IRE1 y ATF6
 - b. Expansión del retículo endoplásmico rugoso; observando por microscopia electrónica de barrido, que las fibras celulares del cristalino presentaban distorsión, de forma irregular y se encontraban pobremente alineadas, además de anormalidad en la membrana lateral.
 - c. Todo esto mostrando que estaba relacionado con la formación de cataratas
3. Engler et al. en 2010 encontraron en pacientes humanos con Distrofia de Fuchs (distrofia en córnea), que:
 - a. Los niveles de GRP78, eIF2 y CHOP estaban significativamente incrementados en el endotelio corneal de pacientes con distrofia de Fuchs.
 - b. Además confirman la observación de un incremento en el tamaño del RER conteniendo material granular fino.
 - c. Lo cual sugiere que el estrés en el RE juega un papel aun no resuelto, que lleva a la apoptosis de las células endoteliales mediada por la RPMC, como un mecanismo patogénico en la distrofia de Fuchs

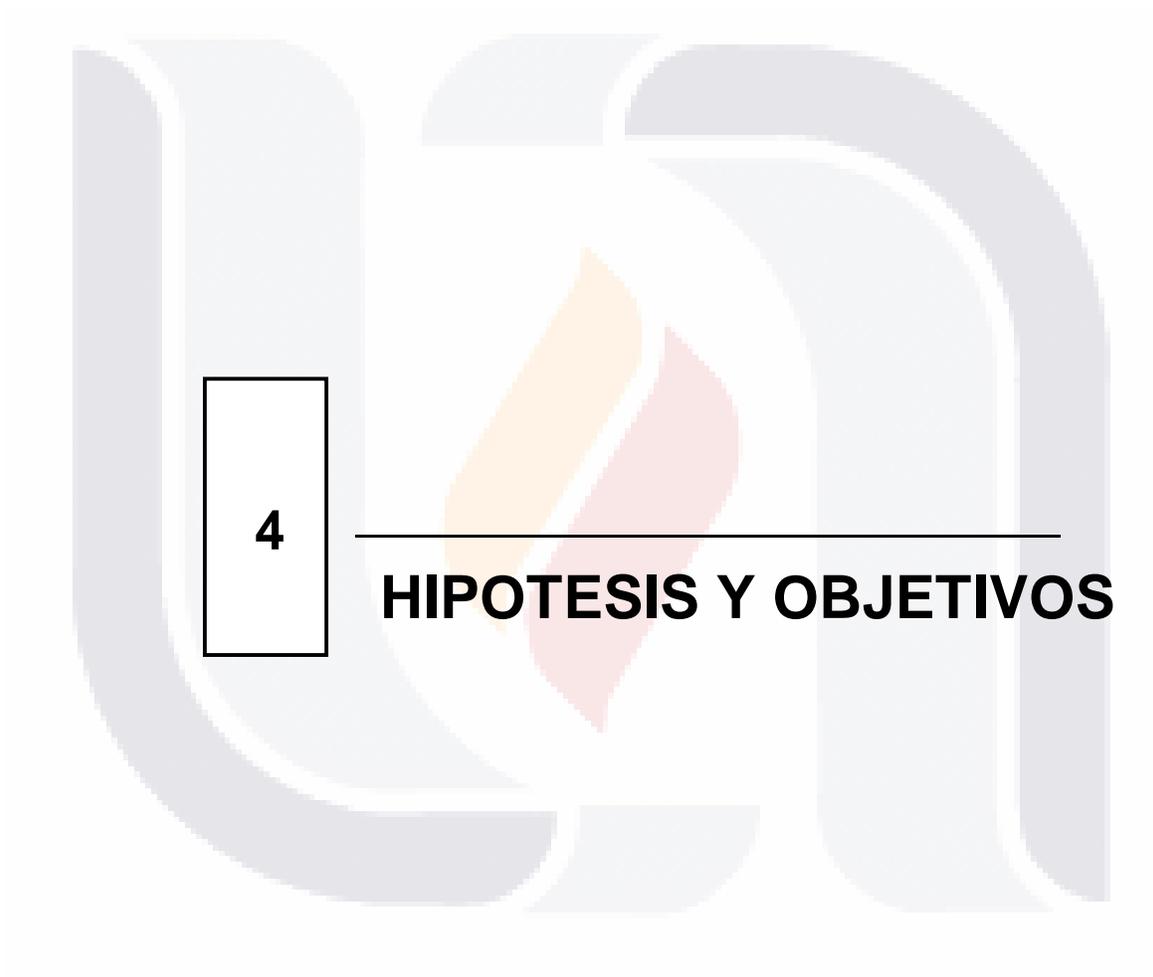


3

JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACION

En la actualidad la *diabetes mellitus* se ha convertido en un importante problema epidemiológico a nivel mundial, se tiene una prevalencia estimada que el número de personas que padecerán esta enfermedad para el año 2030 será de 483 millones de pacientes. Por desgracia, esta enfermedad hace que los pacientes que la padecen presenten complicaciones secundarias en distintos órganos. Una de las muchas complicaciones son las oculares, dándose a conocer que cada año 10,000 pacientes diabéticos pierden la vista en edad productiva, debido a la presencia de retinopatía diabética y cataratas. Las cataratas pueden definirse como una opacidad en el cristalino que provoca pérdida en la agudeza visual. Las cataratas pueden ser de diferentes tipos, sin embargo, se ha observado que aparecen de manera temprana en el 85% de pacientes que padecen *diabetes mellitus* tipo 2. La patogénesis de esta enfermedad aun es desconocida, sin embargo, en los últimos años y por medio de investigaciones hechas exclusivamente en modelos animales, se ha encontrado evidencia que la formación de cataratas secundarias a la hiperglucemia está asociada con el estrés osmótico, el estrés oxidativo y productos finales de la glicosilación. Es debido a que se presentan estos tipos de estrés a la célula que este grupo de investigación quiere comprobar si hay activación de la llamada RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL CONFORMADAS, la cual es una respuesta adaptativa de la célula inducida por la acumulación de proteínas mal conformadas dentro del retículo endoplásmico. Y es que las proteínas comenzarán a estar mal conformadas debido a estrés celular de cualquier tipo. La activación de esta respuesta, en los últimos años ha sido muy estudiada en enfermedades de tipo conformacionales como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson; así como en la *Diabetes Mellitus*.



4

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Existe activación de la respuesta a proteínas mal conformadas en células del cristalino de pacientes diabéticos con cataratas.

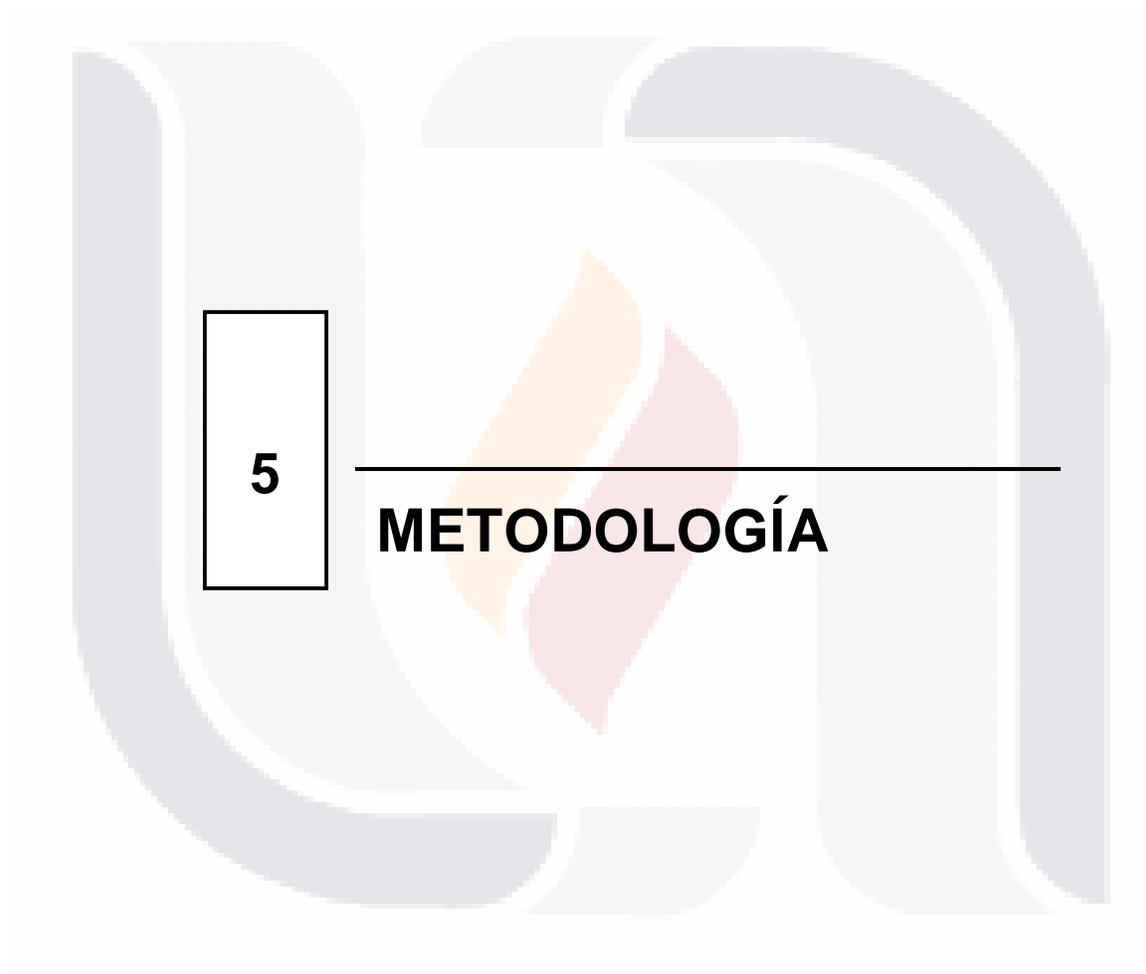
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación de la respuesta a proteínas mal conformadas en pacientes con complicaciones oculares secundarias a *diabetes mellitus*.

OBJETIVO PARTICULARES

1. Determinar la presencia de los componentes de la respuesta a proteínas mal conformadas, en pacientes con catarata diabética.
2. Comparar la diferencia morfológica entre un cristalino sin catarata y un cristalino con cataratas.
3. Analizar la expresión morfológica de GRP78 en un cristalino con catarata senil y con catarata diabética.
4. Analizar la expresión morfológica de ATF6 en un cristalino con catarata senil y con catarata diabética.
5. Determinar la expresión de los genes de la respuesta a proteínas mal conformadas en células del cristalino de pacientes que presenten cataratas diabéticas.



5

METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL DE ESTUDIO

Tipo de muestra

- a) Cristalino de pacientes con cataratas diabéticas.
- b) Cristalinos de pacientes no diabéticos que presenten catarata senil.
- c) Al menos un cristalino normal obtenido post-mortem de un paciente sano que haya muerto por causas accidentales.

Estas muestras fueron obtenidas previo consentimiento autorizado por el propio paciente, el cual fue sometido a cirugía para retirar cataratas por técnica extracapsular, por los oftalmólogos del equipo médico del departamento de Segmento Anterior de INOVA Visión Quirúrgica S.C., obteniéndose cristalinos de pacientes diabéticos y no diabéticos; y en el caso de los cristalinos normales obtenido post-mortem previo consentimiento autorizado como donador de órganos en el Banco de Ojos de la ciudad de Aguascalientes; Aguascalientes. Este trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de bioética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CIB-UAA-02)

Criterios de Inclusión

- Pacientes mayores de 18 años con consentimiento informado.
- Pacientes con catarata metabólica o senil que serán sometidos a cirugía de catarata.
- Pacientes que presenten estudios preoperatorios y valoración preoperatoria completa (BH, QS3, EGO y Hb1Ac, EKG, ASA).

Criterios de Exclusión

- Pacientes menores de 18 años.
- Pacientes que no otorguen su consentimiento informado.
- Pacientes con otras complicaciones propias de la *diabetes* como nefropatía o neuropatía.
- Pacientes que no sean candidatos a cirugía de catarata.

Criterios de Eliminación

- Pacientes cuyas muestras sean insuficientes en cantidad o calidad para su evaluación.
- Pacientes con expediente incompleto.

Preservación de las muestras.

Una vez obtenidos los cristalinicos con catarata inmediatamente después de ser retirados quirúrgicamente; son colocados en una caja de Petri en la cual son cortados en cuadrantes para su posterior procesamiento. Unos cuadrantes fueron fijados en paraformaldehído al 4% para su inclusión en parafina o bien se fijaron en glutaraldehído al 3% para la inclusión en resinas LR-White y/o EPON. Otros de los cuadrantes del tejido fueron almacenados en un crio-vial para su congelación a -70°C para su posterior procesamiento por PCR.

5.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Preparación de cristalinicos para ser observados en Microscopio Electrónico de Barrido.

Las muestras se sometieron a un proceso de alto vacío, para éste se necesitó de un proceso de deshidratación y recubrimiento con oro. El procedimiento para obtener las fotografías con el MEB, fue el siguiente; se colocaron los cristalinicos en viales de 1cm de alto por 1 de ancho, con un poro de 78 micras de apertura de malla aproximadamente para sumergirlos en alcoholes graduales de 70%, 80%, 90% y 100% para deshidratarlos, se dejaron en alcohol absoluto durante 24 horas. Después de esto se colocaron los viales en la cámara de punto crítico TOUSIMIS para remover cualquier traza de humedad que tuviera la muestra. Ya deshidratados los cristalinicos se colocaron en stubs previamente preparados con la cinta adhesiva en la parte superior para sostener la muestra. Por último se cubrieron con oro y ya cubiertos con oro los stubs con la muestra en la cámara de vacío del Microscopio Electrónico de Barrido JEOL LV-5900 para su examen.

Inclusión de muestras en parafina.

Una vez que las muestras fueron fijadas se lavaron en agua corriente por 30 minutos y se procedió a su procesamiento en el HISTOQUINET; el cual primero se sometió a una deshidratación por pases en alcoholes de concentración ascendente y que van del 70% al 100%, cada pase se lleva a cabo en una hora aproximadamente. Enseguida se procedió al aclaramiento en dos pases de xileno cada uno por una hora aproximadamente y por último se hizo la inclusión en parafina en dos pases de dos horas cada uno y obteniéndose el bloque.

Obtención de cortes de parafina.

La obtención de cortes se hizo en el micrótopo Leica RM 2125RT; los cortes obtenidos fueron de 5 micrómetros de espesor y se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA).

Tinción de Hematoxilina-Eosina.

Se desparafinizaron los cortes de 5 micrómetros de espesor en estufa a 56°C por dos horas aproximadamente y después dos veces con xileno concentrado durante 5 minutos cada vez. Se re-hidrataron los cortes en una serie de pasos de alcohol etílico de concentración descendente que van de 100%(2 veces), 96%(2 veces), 80% y 70% durante 5 min en cada paso. Enseguida se tiñeron con hematoxilina de Harris por 5 minutos y después se hizo un viraje con agua corriente por 3 minutos, seguido a esto se hizo la tinción con eosina alcohólica por dos minutos y después se deshidrataron en pasos de alcoholes de concentración ascendente, iniciando en 80%, luego dos veces en alcohol etílico al 96% y al 100% durante 5 minutos en cada paso. Finalmente se hizo un aclaramiento en dos pasos de xileno durante 5 minutos cada uno y se hizo el montaje con resina sintética.

Inmunohistoquímica en cortes de parafina.

Se desparafinizaron los cortes de 5 micrómetros en estufa a 56°C por dos horas aproximadamente y después con xileno concentrado y en una serie de diferentes concentraciones de alcohol etílico que van del 70% hasta el 100%, enseguida se enjuagaron con agua corriente durante 5 min. Los portaobjetos se colocaron en un portalaminillas de metal y fue introducido por dos minutos en 2 litros de buffer de citrato de sodio pH 6.0 (condiciones del buffer) dentro de una olla de presión, dejando que esta subiera a lo máximo, enseguida se apagó la olla, se dejó reposar y hasta que se enfrió se pudo abrir. A continuación se pasaron las laminillas a Buffer de Fosfato Salino (PBS) 1X pH7.4. Para la permeabilización de la membrana las laminillas con los tejidos, se dejaron durante 30 minutos en PBS-Tritón X100 0.2% y enseguida se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con suero fetal bovino al 20% en PBS-Tritón X-100 0.2% para evitar los entrecruzamientos de las proteínas. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda para incubar el primer anticuerpo (anticuerpos de conejo policlonales para GRP78/BiP (AB21685) y ATF6 (AB37149) de Abcam en concentraciones de 1:400 y 1:600 respectivamente que diluimos con PBS-Tritón X-100 0.2%-BSA 3%)

durante toda la noche. Al día siguiente las laminillas se lavaron con PBS-Tritón X100 y se incubaron con el anticuerpo secundario unido al cromógeno diluido (AlexaFluor 488 goat labeled secondary antibody de Molecular Probes, Eugene Oregon), por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y luego se incubaron 10 minutos con Hoechst 1X en PBS. Volvieron a ser lavadas con PBS y por último se cubrió el tejido para su montaje con glicergel (DAKO, Dinamarca) procurando no dejar burbujas.

Inmunofluorescencia en cortes de parafina.

Se desparafinizaron los cortes en estufa a 56°C por dos horas aproximadamente y después con xileno concentrado y en una serie de diferentes concentraciones de alcohol etílico que van del 70% hasta el 100%, enseguida se enjuagaron con agua corriente durante 5 min. Los portaobjetos se colocaron en un portalaminillas de metal y fue introducido por dos minutos en 2 litros de buffer de citrato de sodio pH 6.0 dentro de una olla de presión, dejando que esta subiera a lo máximo, enseguida se apagó la olla, se dejó reposar y hasta que se enfrió se pudo abrir. A continuación se pasaron las laminillas a Buffer de Fosfato Salino (PBS) 1X pH 7.4; Para la permeabilización de la membrana las laminillas con los tejidos, se dejaron durante 30 minutos en PBS-Tritón X100 0.2% y enseguida se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con suero fetal bovino al 20% en PBS-Tritón X-100 0.2% para evitar los entrecruzamientos de las proteínas. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda para incubar el primer anticuerpo (anticuerpos de conejo policlonales para GRP78/BiP (AB21685) y ATF6 (AB37149) de Abcam en concentraciones de 1:400 y 1:600 respectivamente que diluimos con PBS-Tritón X-100 0.2%-BSA 3%) durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron con PBS-Tritón X-100 0.2% y entonces fueron incubados con anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa (HRP) de DAKO Envision (K1490) durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Todas las laminillas fueron lavadas con PBS y se incubaron con Diaminobencidina hasta que se desarrolle color, se volvieron a lavar con PBS pH 7.4 y se contrastaron con hematoxilina durante 1 minuto. Por último se deshidrató el tejido con etanol al 100% y xileno concentrado y el tejido fue cubierto con un medio de montaje rápido llamado Entellan de la marca Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, procurando no dejar burbujas.

Inclusión de muestras en resina EPON.

Una vez que la muestra fue fijada se lavó con solución de PBS y se procedió a la post-fijación con tetraóxido de osmio 1%, las muestras fueron colocadas en esta solución durante 2 a 4 horas en refrigeración; después de las 2 horas se lavaron 3 veces por 10 minutos nuevamente con PBS. Después de que la muestra fue lavada, se deshidrató utilizando una serie de alcoholes graduales que están a concentraciones desde el 60% hasta el 100%. Del alcohol de 60% hasta el 90% las muestras fueron incubadas en cada concentración durante 5 minutos, cuando fue hecho el cambio al alcohol absoluto de todas las muestras se hicieron 3 cambios de 10 minutos cada uno. Después de la deshidratación con alcoholes se hicieron dos cambios a óxido de propileno durante 10 minutos cada uno. Posteriormente y antes de la inclusión final se procedió a hacer dos cambios a diferentes proporciones de óxido de propileno con resina EPON; el primer cambio fue en proporción 1:1 de óxido de propileno con EPON durante una hora con el frasco que contiene a las muestras tapado. El segundo cambio fue a una solución de óxido de propileno y EPON 1:3 durante una hora con el frasco tapado. Finalmente los fragmentos de muestra fueron colocados en el molde para su inclusión cuidando de no tocarlos con la mano y debidamente orientados, una vez que están correctamente acomodados el molde fue llenado única y exclusivamente con resina EPON dejándolo durante 24 horas en estufa a 65°C.

Inclusión de muestras en resina LR-White.

Una vez fijada la muestra, se lavó con solución de PBS y se post-fijó con tetraóxido de osmio 1% diluido con Cloruro de Calcio al 1%, las muestras fueron colocadas en esta solución de 2 a 4 horas en refrigeración; después de 2 horas se lavaron 3 veces por 10 minutos nuevamente con PBS. Después las muestras se deshidrataron mediante una serie de alcoholes a concentraciones crecientes graduales desde 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, por 15 minutos en cada alcohol. Posteriormente se procedió a la pre-inclusión en mezclas de diferentes proporciones de resina-alcohol. El primer paso es en proporción 1:1 de resina LR-White (London resin products)-alcohol etílico durante dos horas a 4°C, se hizo el cambio de resina 2:1 alcohol y se dejó nuevamente a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se cambió a resina 3:1 alcohol etílico absoluto incubándolo durante 4 horas a 4°C, en el último paso se hizo el cambio a resina puque se dejó durante toda la noche a 4°C y la inclusión final se hizo al día siguiente cambiando

las muestras en tubos Eppendorf y dejando polimerizar durante 24 . 48 horas a 56°C en estufa.

Obtención de cortes de bloque de resinas.

La obtención de cortes se hizo en el ultramicrotomo Leica UCT; los cortes semi-finos se hicieron a 300 nm de espesor cuando se comenzó a cortar, su montaje es sobre portaobjetos. La obtención de cortes de 80 nm de espesor se hizo usando cuchilla de diamante y su montaje se hizo en rejillas de níquel.

Tinción con Azul de Toluidina

Esta tinción se hizo sobre los cortes semi-finos en los portaobjetos con el fin de observar la zona del tejido que se ha incluido en que se está localizado. Se puso una gota de colorante azul de toluidina sobre el corte y se colocó sobre la parrilla hasta que la gota secase, se lavó con agua bi-distilada, se secó y se observaron al microscopio.

Inmunohistoquímica con anticuerpos de Inmuno-oro.

Los cortes del cristalino de 80 nm de grosor obtenidos con Ultramicrotomo fueron colocados en rejillas y se incubaron con PBS-ASB-1% 45 min, enseguida fueron colocados en el primer anticuerpo, los cuales fueron ATF6 (AB37149) y GRP78 (AB21685) marca Abcam diluido 1:20 en PBS+ASB 1% siendo incubados por 2 horas a 37°C., después se lavaron 10 veces con PBS + ASB 1%. Se incubaron con el segundo anticuerpo marcado con oro coloidal (Goat pAb to rabbit IgG 10 nm de Abcam) que fue diluido 1:50 durante 1 hora a 37 °C y 30 min a temperatura ambiente, enseguida se lavaron con PBS-ASB 1% 10 veces, se fijaron con glutaraldehído1% por 15 min y por último se lavaron con agua bidestilada y filtrada. El último paso fue la contrastación con uranilo y plomo.

Contrastación con Uranilo y plomo

Los cortes fueron colocados en rejillas y se colocaron sobre una gota de 50 µl de acetato de uranilo al 5% con agua bi-distilada por 20 minutos, después de ese tiempo se lavó perfectamente con agua bi-distilada y después se colocó durante 1 minuto en una gota citrato de plomo (Venable; 1965) en enseguida se lavaron nuevamente en agua destilada.



6

RESULTADOS

6.1 Muestras obtenidas.

TABLA 2. INFORMACION EPIDEMIOLOGICA		CRISTALINOS CON CATARATAS SENILES	CRISTALINOS CON CATARATAS DIABETICAS	CRISTALINOS NORMALES
NUMERO DE CASOS		11	9	3
GENERO	M	6	5	1
	F	5	4	2
EDAD PROMEDIO (AÑOS)		78	62	33
TIPO DE CATARATA		NUCLEAR	NUCLEAR	NA
GRADO DE CATARATA		4	4	
MEDICACION		CAPTOPRIL	METFORMINA GLIBENCLAMIDA	
DURACION DE DIABETES (AÑOS)		NA	11	NA

Los cristalinios normales, obtenidos post-mortem fueron de tres pacientes los cuales previo consentimiento autorizado de familiares, fueron donados al Banco de Ojos de la ciudad de Aguascalientes; Ags., estos cristalinio se encontraba en perfectas condiciones. La edad promedio de los donadores fue de 33 años de edad sin enfermedades crónico degenerativo, sin ninguna otra enfermedad a la fecha de su deceso la cual fue por causas accidentales. Estos cristalinios normales presentaban total transparencia, eran blandos y sus bordes eran regulares

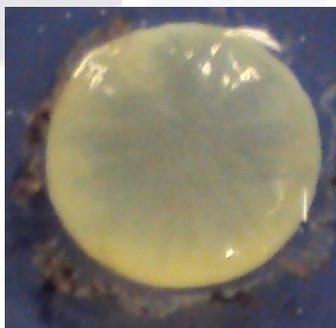


Figura 10. Cristalino normal de paciente sano. El tejido se observa en perfecto estado, era transparente, firme y de bordes regulares.

Los cristalinicos de pacientes con cataratas diabéticas o cataratas seniles, fueron obtenidos previo consentimiento autorizado de pacientes programados para cirugía de cataratas por el departamento de Segmento anterior de INOVA Visión Quirúrgica S.C y entraban dentro de este estudio cumpliendo con todos los criterios de inclusión. Los cristalinicos con catarata eran cristalinicos que en general se pueden observar oscurecidos, de color ámbar o amarillentos, duros y con bordes irregulares.



Figura 11. Cristalino con catarata senil. Se observó que este tejido presentaba color ámbar, era duro y de bordes irregulares.

6.2 Análisis morfológico.

Se conoce que el cristalino es un lente biconvexo, transparente que presenta gran claridad y organización. Como anteriormente se había mencionado las proteínas que integran al cristalino son solubles en la juventud y se van transformando en insolubles en el adulto, ya que como sabemos el cristalino crece constantemente por que su epitelio no se elimina, sino que se transforma en fibras, en este proceso de diferenciación las fibras degradan el núcleo, las mitocondrias y otras membranas que evitan la síntesis de nuevas proteínas, lo que a su vez provoca que en las fibras celulares maduras los sistemas enzimáticos sean no funcionales, lo que le resta elasticidad y transparencia. El cristalino forma nuevas fibras a lo largo de toda la vida, las fibras viejas se comprimen centralmente para formar un núcleo cristaliniano inelástico cada vez mayor (Kaufman y Alm; 2004). El proceso de diferenciación de las células del cristalino para convertirse en fibras del cristalino, se caracteriza por la síntesis y acumulación de proteínas cristalinianas. Las cristalinianas constituyen hasta el 40% del peso húmedo de las fibras del cristalino, lo que representa una concentración proteica alrededor de tres veces mayor de la existente en el citoplasma de células típicas (Kaufman y Alm; 2004). Las proteínas

lenticulares suelen agruparse en dos categorías según su solubilidad en agua. A medida que envejece el cristalino, aumenta de peso y de grosor y disminuye su poder de acomodación y se van formando nuevas capas concéntricas de fibras corticales, el núcleo cristalino experimenta una compresión y endurecimiento (esclerosis nuclear). La modificación química y la descomposición proteolítica de las cristalinas (proteínas del cristalino) dan lugar a la formación de agregados proteínicos de alto peso molecular que alcanzan un tamaño suficiente como para ocasionar fluctuaciones bruscas del índice refractivo local del cristalino dispersando la luz y disminuyendo la transparencia de este. La modificación química de las proteínas nucleares del cristalino también aumenta la pigmentación, después de que el cristalino adopte un tono amarillo pardusco con el paso del tiempo (Bobrow; 2008). Lo que se encontró en esta investigación es que evidentemente en el cristalino del paciente joven y sin enfermedades (Figura 12), la cápsula y cuerpo se encontraban en buen estado y sin daño alguno; se observaron también las características propias de las fibras como su forma hexagonal, organizadas, alineadas, presencia lateral de las interdigitaciones en forma de %ojinetes+de las fibras del cristalino (Figura 12-B, localizado como ID), las cuales facilitan la estabilización de las membranas laterales de las fibras de manera que quedan estrechamente unidas al momento de presentarse el fenómeno de acomodación, que consiste en la relajación de las fibras zonulares, con la consecuente modificación del cristalino que tiende a hacerse más convexo y de esta forma aumenta su potencia como lente debido a la contracción del músculo ciliar (fibras circulares). Mediante la acomodación podemos conseguir focalizar en la retina los objetos situados entre el *punto remoto* (punto más lejano que se ve nítido) y el *punto próximo* (punto más cercano que se ve nítido (Kaufman y Alm; 2004). A diferencia del cristalino del paciente sano encontramos que los cristalinos con catarata senil o diabética (Figura 13) presentaron daño similar entre sí, encontrando que en estos se presentaron alteraciones estructurales, como desorganización y desalineación de las fibras de los cristalinos y pérdida de la mayoría de las interdigitaciones que en condiciones normales se pueden observar. Otro dato importante observado fue la formación de agregados proteínicos en las fibras como se aprecia en la Figura 13-B, esta imagen fue muy significativa pues al compararla con la Figura 12, los cambios de un cristalino a otro son muy evidentes.

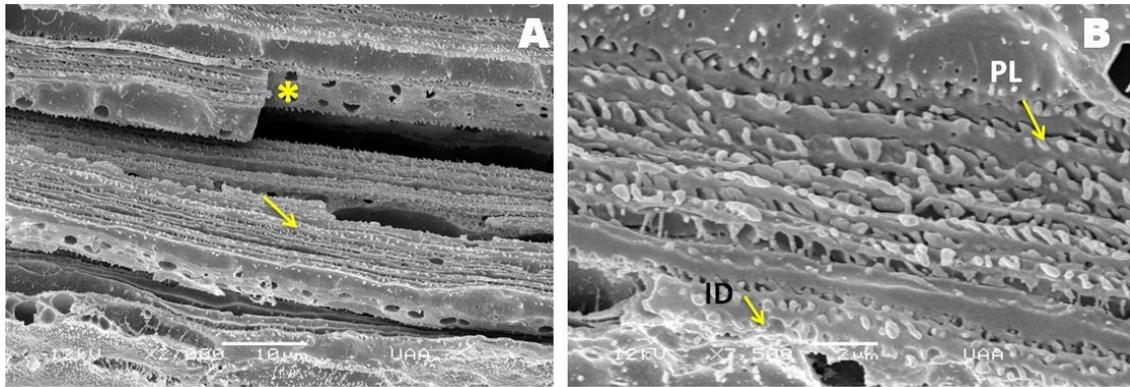


Figura 12. Imágenes tomadas con Microscopio Electrónico de Barrido de cristalino normal. En A se observa una vista panorámica de fibras del cristalino (2000X). Se aprecia la organización, alineación e interdigitaciones (flecha) características de las fibras cristalinas. Las estructuras como orificio (*), son conexiones intercelulares normales conocidos en inglés como ball and socket (*) (Jongebloed et al., 1998). En B, a mayor aumento se observan las fibras del cristalino, con sus prolongaciones laterales (PL) e interdigitaciones (ID) (7,500X). Imágenes obtenidas con Microscopio Electrónico de Barrido LV-5900, JEOL de UAA campus Norte (Edificio 202)

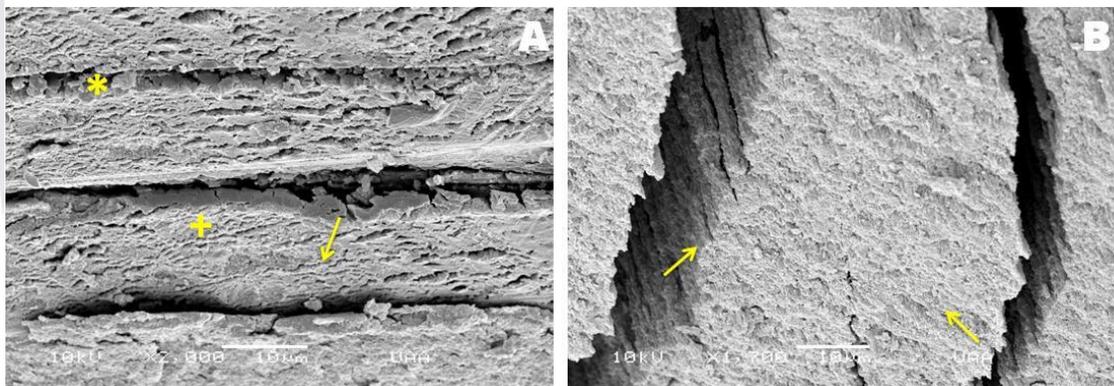


Figura 13. Imágenes de Microscopio Electrónico de Barrido de Cristalinos con Cataratas. (A) Se observan las fibras del cristalino (*) paralelas con pérdida de sus interdigitaciones (flechas) y separación anormal de las fibras, por lo que dan aspecto de fusionadas (+) (2000X). (B) Corte transversal de fibras del cristalino con pérdida de organización y fusión o compactación entre ellas, característica propia de la enfermedad de catarata en el cristalino (1500X). Imágenes obtenidas con Microscopio Electrónico de Barrido LV-5900, JEOL de UAA campus Norte (Edificio 202)

6.3 GRP78 en células del cristalino.

Con la finalidad de analizar la presencia del regulador maestro de la respuesta a proteínas mal conformadas conocido como GRP78, se realizaron tres técnicas histológicas diferentes, en los tres grupos de tejidos obtenidos, cristalino normal, cataratas seniles y cataratas diabéticas. De esta manera no fue detectado GRP78 en las células del cristalino normal, usando la técnica de inmunohistoquímica tradicional e inmunofluorescencia (Figura 14a-NL y 15a-NL). Con la finalidad de aumentar la sensibilidad del estudio se realizó inmuno-oro con anticuerpos de oro coloidal de 10 nm con captura de imágenes mediante el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM-2100. Usando esta técnica, se documentó una mínima presencia de GRP78 en las fibras y las células de la zona de transición del cristalino sano (Figura 16a-NL).

En las muestras de cataratas seniles detectamos a GRP78, el regulador maestro de la respuesta a proteínas mal conformadas, en las células de este cristalino, detectándolo por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (Figura 14b-SCL y 15c-SCL). Este hallazgo fue confirmado usando el Microscopio Electrónico de Transmisión con la técnica de inmuno-oro (Figura 16b-SCL). A los cristalininos de pacientes diabéticos con catarata también se les realizó análisis de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e inmuno-oro (Figuras 14, 15 y 16) para conocer si se podía detectar GRP78 en las células del tejido encontrando que efectivamente GRP78 se encontraba activo en las células de cristalininos con catarata diabética. En especial, la fluorescencia que se observó por la técnica correspondiente fue más intensa (Figura 15c-DCL). La intensidad de la fluorescencia fue mayor en muestras de pacientes diabéticos comparada con el sano y el senil.

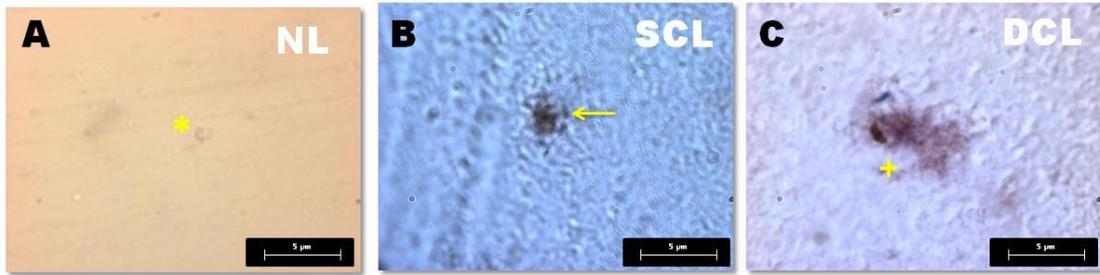


Figura 14. Detección del regulador maestro GRP78 por Inmunohistoquímica.

A) imagen de cristalino normal (**NL**) donde la célula no presenta reactividad a la peroxidasa de las proteínas, por lo que apenas se observa una célula sin teñir (*).

B) En las células del corte de cristalino con catarata senil (**SCL**) fue detectado GRP78 (flecha), al igual que en **C)** que corresponde a tejido con catarata diabética (**DCL**), solo que en estas células del cristalino, la marca de la DAB por positividad a GRP78 es más intensa (+).

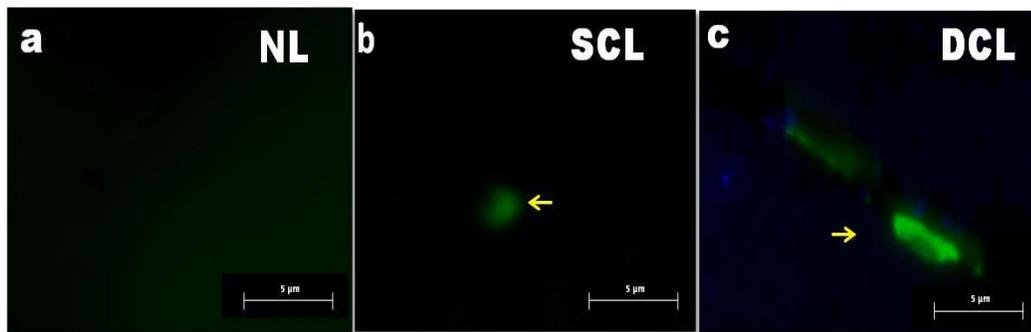


Figura 15. Detección del regulador maestro GRP78 por

INMUNOFLUORESCENCIA. En a) se observa que no hay expresión de esta proteína en el cristalino normal sin catarata (NL). En b) las células del corte de cristalino con catarata senil (SCL) muestran la presencia tenue de GRP78, sin embargo, al compararla con la imagen de c) que corresponde a células de cristalino de paciente con catarata diabética, podemos observar señal más intensa de GRP78. Imágenes obtenidas en Microscopio de Inmunofluorescencia Axioscop 40, Zeiss UAA campus Norte (Edificio 202).

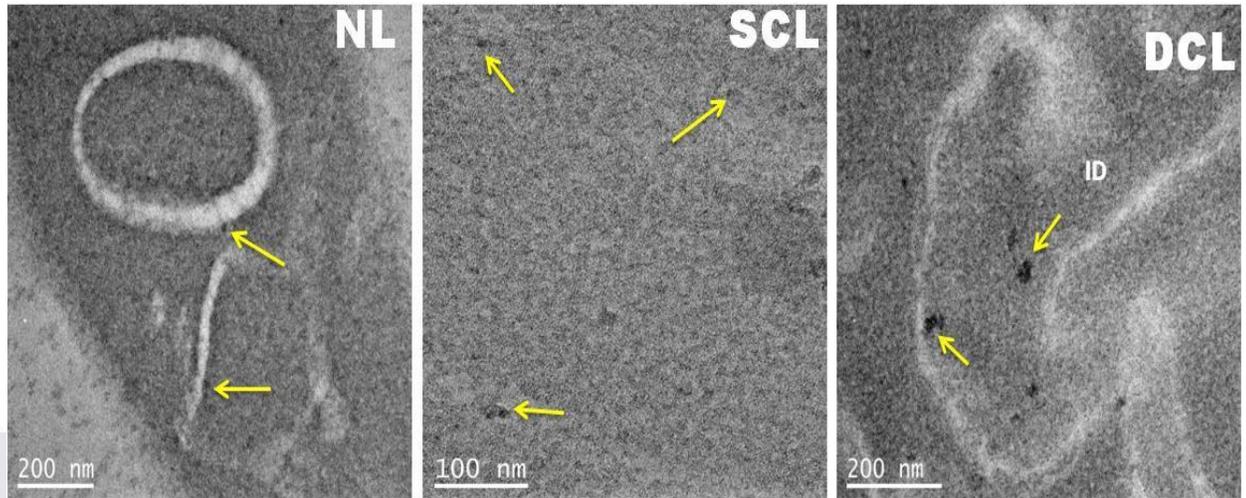


Figura 16. Detección de GRP78 por inmuno-oro de 10 nm. a) Cristalino normal (NL), se observa que la detección de GRP78 es tenue en algunas zonas del citoplasma de la célula mediante escasos depósitos de granos negros electrondensos (flechas). **b)** en el cristalino con catarata senil (SCL) se puede observar la detección un poco más abundante de GRP78 por inmuno-oro en el citoplasma de la célula (flechas). Finalmente, en **c)** esta proteína que representa el regulador de la RPMC se observa intensamente en catarata de paciente diabético (DCL). La marca de oro coloidal se acumula tanto en citoplasma como en interdigitaciones (ID) de la célula, por lo que pueden verse acumulaciones de los gránulos electrondensos en estas zonas (flechas). Imágenes obtenidas con JEM-2100F, Transmision Electron Microscope, JEOL de la UAM campus Iztapalapa

6.4 Presencia de ATF6 en células del cristalino

Analizamos la expresión de ATF6, que es el transductor del brazo transcripcional de la respuesta a proteínas mal conformadas, de la misma manera que en la secuencia previa; tejidos de cristalinos normales, seniles y diabéticos. En las células del cristalino sin catarata no se detectó ATF6 con inmunohistoquímica ni con inmunofluorescencia, o con anticuerpos de oro coloidal, observados con microscopia electrónica de transmisión. Encontramos detección positiva del transductor de la respuesta a proteínas mal conformadas, ATF6, en las células del cristalino con catarata senil. Este resultado fue confirmado por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica y usando el microscopio electrónico de transmisión con la técnica con anticuerpos de oro coloidal. En todas y cada una de las técnicas que se realizaron había detección de ATF6 (Figuras 17, 18 y 19). Finalmente, encontramos

que el transductor ATF6 de la respuesta a proteínas mal conformadas estaba activado en células del cristalino de pacientes con catarata diabética en un patrón similar a GRP78 por lo que detectamos una presencia más intensa de ATF6 en este tejido de cristalino diabético contra el cristalino senil (Figura 18b-SCL vs 18c-DCL) y (Figura 19b-SCL vs 19c-DCL.)

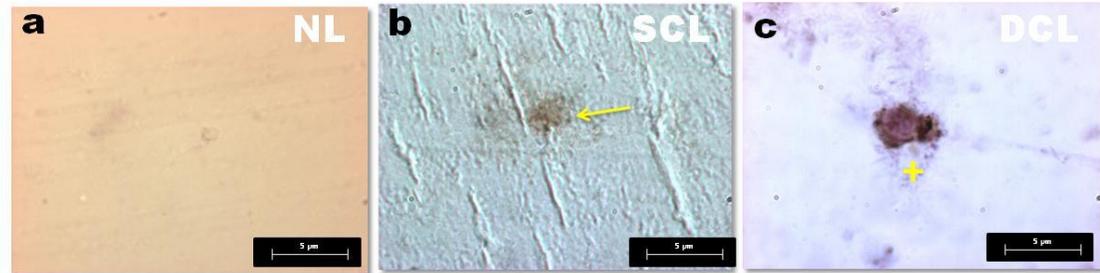


Figura 17. Expresión del transductor ATF6 por Inmunohistoquímica. a) En las células del cristalino del paciente sano no se observó expresión de ATF6. b) Se observa expresión de ATF6 (flecha) en células de cristalino con catarata senil (SCL); c) en cristalino con catarata diabética (DCL) hay sobre expresión de ATF6 (+), al igual que con GRP78.

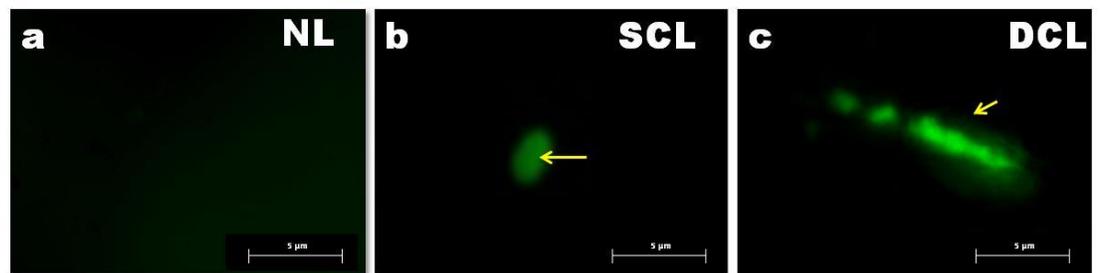


Figura 18. Expresión del transductor ATF6 por IMMUNOFLUORESCENCIA. a) Cristalino normal sin catarata (NL), sin señal positiva a la fluorescencia de células marcadas con la proteína ATF6. b) En muestras de catarata senil (SCL) la detección de ATF6 es positiva (flecha), observándose fluorescencia en la célula del cristalino. c) muestra histológica de cristalino de paciente con catarata diabética (DCL), en estos pacientes, la expresión de ATF6 es más intensa (flecha) con respecto a los otros dos grupos de estudio. Imágenes obtenidas en Microscopio de Inmunofluorescencia Axioscop 40, Zeiss UAA campus Norte (Edificio 202).

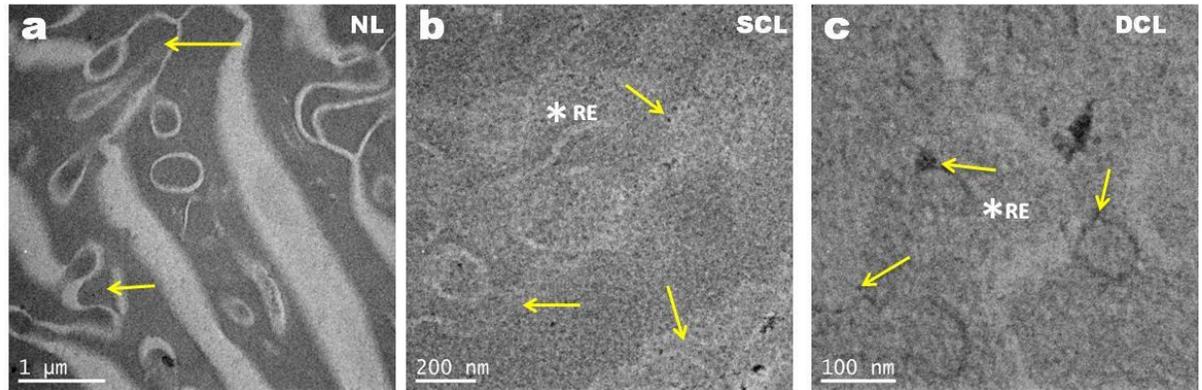


Figura 19. Expresión del transductor ATF6 por inmuno-oro de 10 nm. a) Cristalino normal (NL) en el que no hay detección de ATF6, se pueden observar las fibras cristaliniánas presentando sus características interdigitaciones (flechas). b) Cristalino de paciente con catarata senil (SCL), hay detección positiva de ATF6 (flechas), aunque la marca está dispersa, se puede observar en varias zonas del citoplasma de la célula y del retículo endoplasmático (*RE). c) Cristalino de paciente diabético (DCL), en esta imagen se muestra la detección positiva de ATF6 como marcas de oro coloidal (flechas), observándose en íntima relación con las cisternas del retículo endoplasmático (*RE) de la célula. Imágenes obtenidas con JEM-2100F, Transmision Electron Microscope, JEOL de la UAM campus Iztapalapa

6.5 Cuantificación de marcas de oro coloidal en imágenes del microscopio electrónico de transmisión.

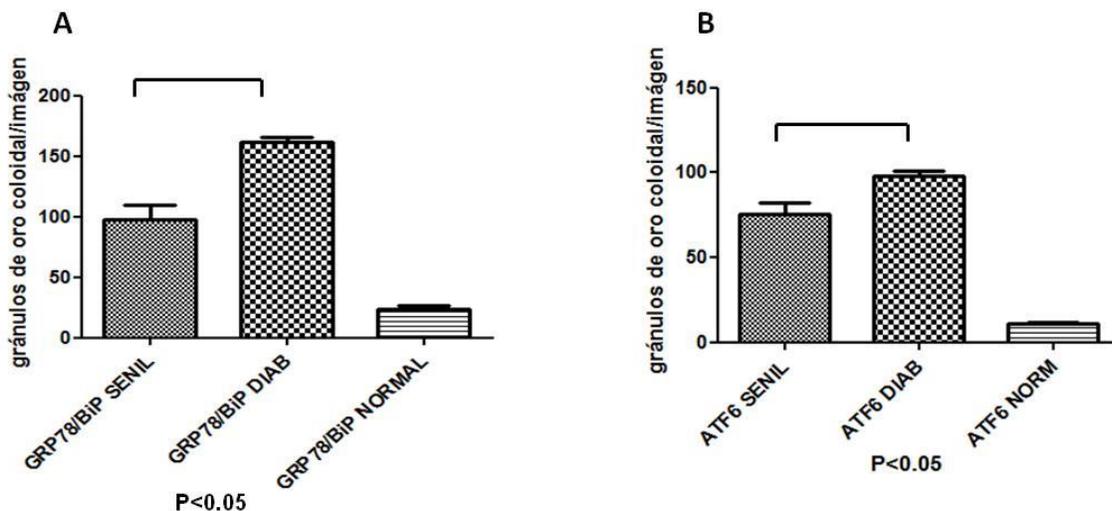


Figura 20. Cuantificación de marca de oro coloidal de las proteínas GRP78 y ATF6 en imágenes del microscopio electrónico de transmisión (MET). En la parte A de la imagen se puede observar que la marca de oro coloidal para GRP78 fue mayor en cristalinicos de pacientes diabéticos con un promedio de 162 granos contra la media detectada en los pacientes seniles que fue de 96 granos ($p < 0.05$); lo mismo se observó para el transductor ATF6 (B) en la que la media detectada fue de 98 contra 76 granos de oro coloidal en cataratas diabéticas y seniles.

En resumen podemos decir, que de los cristalinicos normales obtenidos post-mortem, se usaron como un control para conocer si en los pacientes que no presentaban los factores de senilidad y diabetes mellitus había activación de los componentes de la RPMC, representados en este estudio por GRP78, el regulador maestro, y ATF6 uno de los transductores de la respuesta. Al analizar estos cristalinicos de manera morfológica con el microscopio electrónico de barrido lo que se encontró fue que no había ningún tipo de daño. El cristalinico presentó completas e intactas todas las estructuras características a un aumento de menor, de 23X, (figura no mostrada), al hacer mayores acercamientos pudieron observarse las fibras cristalinianas, demostrando en la figura 12-A, que estas estructuras se encontraban en perfecta alineación, compactación y organización. En la figura 12-B, se mostró que las

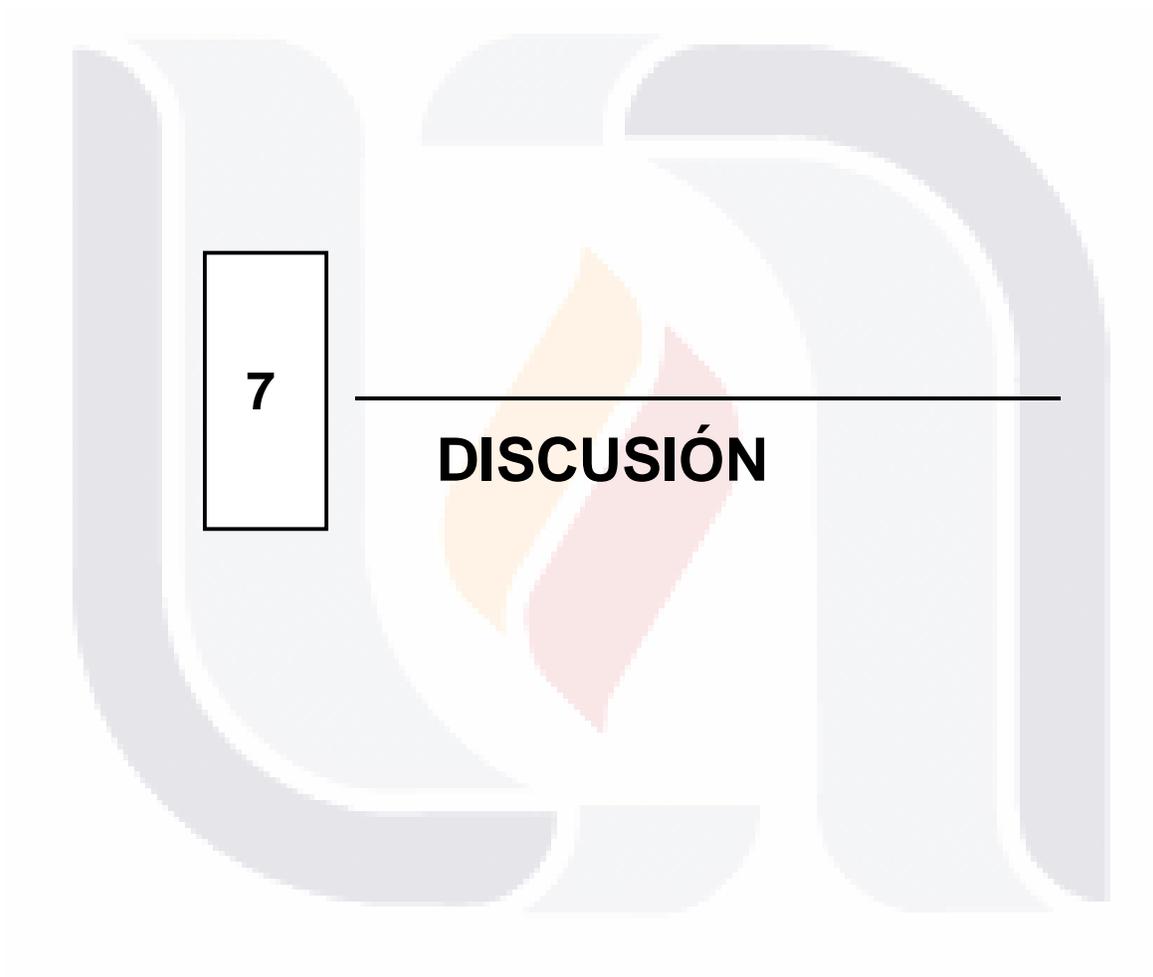
interdigitaciones en forma de **cojinetes** de la superficie lateral de las fibras del cristalino, las cuales facilitan la estabilización de las membranas laterales de las fibras de manera que quedan estrechamente unidas al momento de presentarse el fenómeno de acomodación (Kaufman y Alm; 2004). A diferencia de lo encontrado en el cristalino sin catarata, la morfología de los cristalinos con cataratas diabética o seniles es diferente a los cristalinos normales, pues aunque fue observado que las fibras del cristalino en la fotografía panorámica, con aumentos de 50X (foto no mostrada), comienza a evidenciarse zonas claras que muestran el daño al cristalino. Al hacer acercamientos con mayores aumentos, se puede observar la pérdida de organización y alineación de las fibras cristalinas (Figura 13). Las características interdigitaciones de éstas casi no se notan y esta pérdida parece influir en la aparente fusión de las fibras cristalinas en un agregado proteico (Figura 13-B).

A la par del análisis morfológico a los cristalinos se les realizó la técnica de inmunohistoquímica con DAB para mostrar si en los cortes del tejido había expresión positiva de GRP78 y ATF6 en las tres poblaciones estudiadas. En los cristalinos normales NO se observaron resultados positivos para ninguno de las dos proteínas estudiadas, este resultado se confirmó con la técnica de inmunofluorescencia y con inmunohistoquímica con anticuerpos de oro coloidal de 10 nm y que es la de mayor precisión y sensibilidad encontramos que con esta técnica el resultado era ligeramente positiva, las marcas eran pocas y muy tenues. Al hacer una cuantificación por pixeles de la marca de oro coloidal se encontró que para ATF6 en promedio había un total de 13 gránulos de oro por imagen; mientras que para GRP78 la marca fue mayor y correspondía a 22 gránulos por imagen aproximadamente.

En cuanto a los resultados de GRP78 para los cristalinos con catarata senil y diabética se encontró que por las tres técnicas realizadas, el resultado de los diferentes pacientes en ambos casos de cataratas era POSITIVO. Aquí la diferencia que encontramos con las primeras dos técnicas, inmunohistoquímica con DAB e inmunofluorescencia, es que la detección de GRP78 en los cristalinos de los pacientes diabéticos era mayor que en los pacientes seniles. Para confirmar y tratar de cuantificar estos resultados se realizó a estas muestras inmunohistoquímica con anticuerpos de oro coloidal, confirmándose que la detección de GRP78 en los pacientes diabéticos es mayor que en los pacientes seniles, observándose que en los pacientes diabéticos la marca era más intensa pues había acumulación de gránulos de oro coloidal en diferentes partes del citoplasma de la célula (Figura 16).

Al hacer la cuantificación por píxeles, contando los gránulos de oro coloidal, el resultados que obtuvimos fue que pese a que había acumulación de granos de oro, lo cual dificulta la cuantificación, los resultados para GRP78 en pacientes diabéticos fue de 162 granos de oro coloidal por imagen contra 96 granos de oro en las imágenes de los pacientes con catarata senil.

Los resultados para ATF6 fueron muy similares a los obtenidos para GRP78. La fluorescencia emitida en las células de los cristalinos con catarata diabética era mayor que en las células de los cristalinos con catarata senil, como se observo en las figuras 17 y 18. Para confirmarlo, se observaron cortes con MET y se pudo observar que la marca de oro coloidal en los cortes de cristalinos de pacientes con catarata senil era menor y más dispersa. La marca de oro coloidal en las células de los tejidos de cristalinos con catarata diabética era más intensa, se pudo observar la marca en las cisternas del retículo endoplasmático e incluso en algunas zonas del citoplasma de la célula se encontraba acumulación de gránulos de oro coloidal. En las imágenes de los cristalinos de pacientes diabéticos resultó que había aproximadamente 98 granos de oro coloidal por imagen; mientras que en las imágenes de los cristalinos de los pacientes seniles solo había solo había 76 granos de oro coloidal. Por lo que podemos decir que había activación de ATF6 en células de cristalino con cataratas diabéticas y seniles en las tres técnicas realizadas a los cortes histológicos de los diferentes pacientes, pero era mayor en los cristalinos de pacientes con catarata diabética. Utilizamos la prueba de Mann-Whitney para hacer el análisis estadístico y con este podemos decir que existía una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras analizadas.



7

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Como primera meta se documentaron los cambios morfológicos de un cristalino normal comparado con los cristalinos con cataratas seniles y metabólicas a nivel macroscópico y ultraestructural; para esto, se realizó el análisis morfológico a los cristalinos de pacientes sanos obtenido post-mortem y se observaron sus estructuras características en perfectas condiciones, coincidiendo con lo reportado por Taylor, Al-Ghoul et al., (1996) y Jongebloed van der Want et al., (1998); además fue posible dar evidencias que las técnicas con que se preservó y proceso este tejido fueron las correctas. Comparando el cristalino sano con el cristalino cataratoso se encontraron diferencias morfológicas evidentes pues en el cataratoso se observó pérdida de alineación, organización y degeneración de las interdigitaciones propias de las fibras cristalinas; anteriormente Freel C.D., Al-Ghoul J.K. et al.; (2003), evidenciaron que existían diferencias significativas, detectables y reales entre el tamaño del núcleo de cristalinos de pacientes con cataratas y cristalinos de pacientes sin cataratas pero que eran diabéticos y seniles; encontrándose que el tamaño del núcleo de los cristalinos transparentes es mayor que el de los cristalinos con cataratas, lo cual el autor sugiere se debe a la pérdida de agua citoplasmática lo que lleva a la deshidratación celular y a que en el núcleo del cristalino las fibras cristalinas sean más cortas; además del fenómeno al que nombran compactación de las fibras celulares del núcleo+el cual postulan es un proceso normal que se presenta con la edad y que en la cataratogénesis parece tener un efecto profundo sobre el núcleo, lo cual hace que el tamaño de los cristalinos cataratosos diabéticos o seniles sean menores que los cristalinos transparentes, pues además del acortamiento que sufren las fibras, también se provoca dureza (Costello; 2009). Lo observado por estos autores fue confirmado en nuestro estudio pues en las imágenes del cristalino con catarata diabética se observa una fusión o compactación de las fibras del cristalino; que hace que no se vea la organización e interdigitación de las fibras y que el cristalino comience a parecer un sincitio, además, observamos macroscópicamente que el diámetro total de los cristalinos enteros con cataratas siempre fue menor que el diámetro total del cristalino transparente del paciente sano. En cuanto a si hay algún cambio estructural significativo en el caso de que el cristalino presente una catarata diabética parece ser que hay evidencia de algún cambio ultra-estructural, visto con MET, como son la formación de vacuolas, (Kwuhara et al.; 1969; Costello et al.; 1993), sin embargo, con microscopio electrónico de barrido nosotros no

encontramos ningún hallazgo especial. Lo que si se ha publicado anteriormente es que puede provocar un aumento en la velocidad de compactación de las fibras cristalinas del núcleo; además de que la diabetes provoca que haya formación de cataratas en personas más jóvenes (Freel et al; 2006; Dorairaj et al.; 2002).

La ausencia de GRP78 y ATF6 en cristalinos normales podría indicar que la RPMC es activada como resultado de estrés al retículo endoplasmático en las células del cristalino bajo condiciones patológicas. En cristalinos normales, la homeostasis de la célula es mantenida a través de varios sistemas, incluyendo al glutatión y otras chaperonas. En contraste, nosotros detectamos ambas proteínas, GRP78 y ATF6 en cataratas seniles y diabéticas; esto puede ser posible debido a que en algún punto durante la opacificación de los cristalinos, ambas vías, la senil y la diabética convergen. Ningún autor ha estudiado la respuesta a proteínas mal conformadas en cataratas seniles antes. Sin embargo, nosotros creemos que la RPMC puede ser resultado de un ambiente oxidativo durante la patogénesis de las cataratas relacionadas con la edad. Firtina et al., (2009) encontraron que ATF6 se encontraba expresado en cristalinos de ratones transgénicos que expresaban el gen Col4a, un modelo animal de cataratas. Observaron que había expansión del retículo endoplasmático rugoso en las células del cristalino; así como que las fibras celulares del cristalino presentaban distorsión, se encontraban de forma irregular y se ubicaron pobremente alineadas, con anormalidad en la membrana lateral. Elanchezhian et al., (2012) indujeron estrés en el retículo endoplasmático de las células epiteliales del cristalino usando homocisteína, de esta manera, generaron ERO que resultaron en oxidación y muerte de las células epiteliales del cristalino así como degradación de Nrf2. Así pues, la cascada de enzimas de Nrf2, catalasa y glutatión reductasa, fueron significativamente reducidas, demostrando con esto, que la protección antioxidante dependiente de Nrf2 en las células epiteliales del cristalino es disminuida, lo cual resultan en cristalinos altamente oxidados y que propiciarán la aparición de cataratas relacionadas con la edad (Elanchezhian R.; 2012)

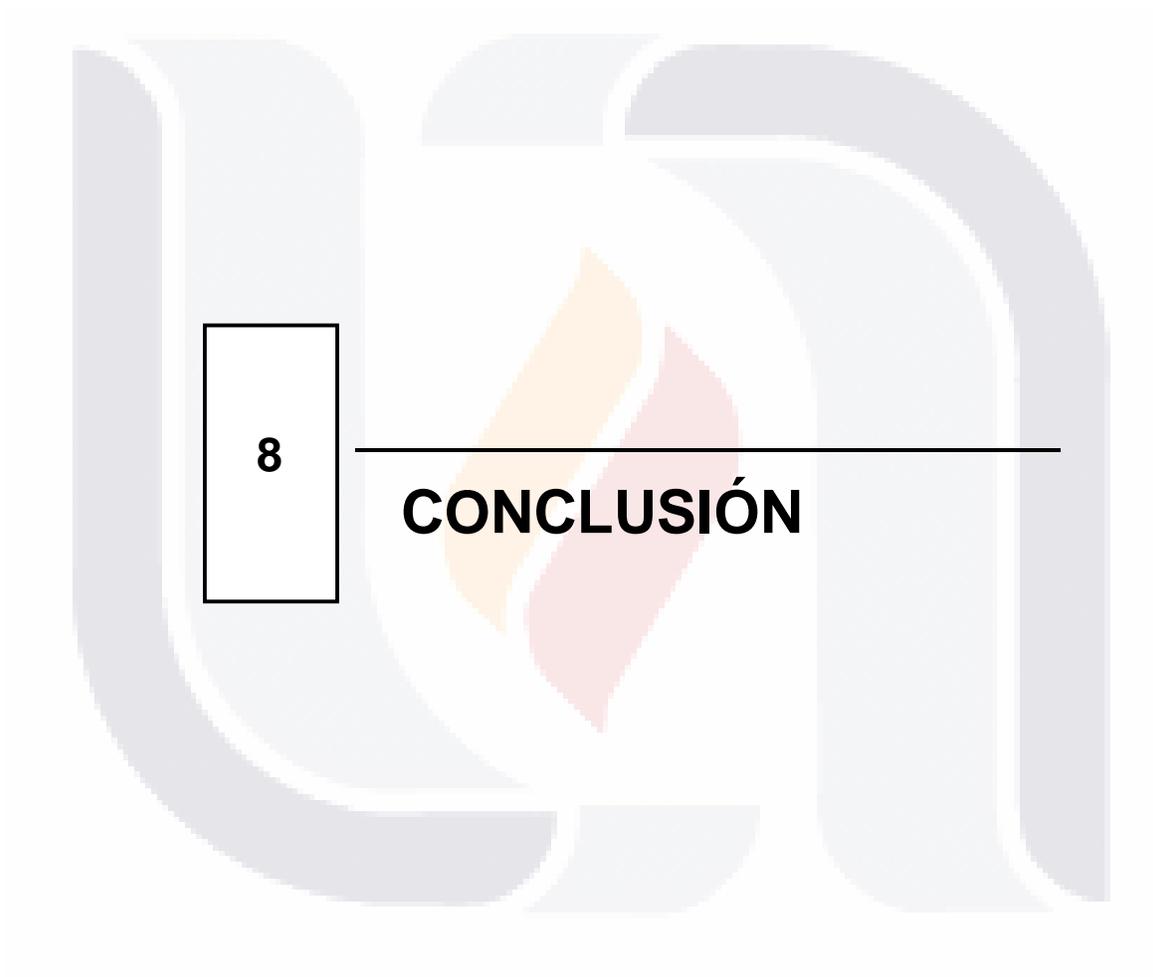
En adultos, las cataratas de diabéticos son difíciles de diferenciar de cataratas de pacientes no diabéticos; a partir de que comienza la aparición de cataratas diabéticas, estas, frecuentemente presentan esclerosis nuclear, lo cual las hace muy parecidas a la típica catarata senil de los pacientes no diabéticos (Bron A.J. et al.; 1998). Han sido observados cambios morfológicos similares en las fibras

nucleares internas de los cristalinicos de pacientes diabéticos y no diabéticos con esclerosis nuclear. Sin embargo, la densidad de las células epiteliales es mucho menor en los cristalinicos con cataratas diabéticas que en los cristalinicos con cataratas de pacientes no diabéticos (Struck et al.; 2000).

De acuerdo a nuestros hallazgos, Mulhern et al., (2006) observaron una detección positiva de GRP78 en los tejidos oculares de ratas galactosémicas, un modelo animal de daño diabético, sugiriendo que la RPMC puede jugar un importante papel en la formación de cataratas en modelos animales. Nosotros creemos que la detección más intensa de proteínas de la RPMC en cataratas diabéticas podría ser resultado del daño acumulado en cristalinicos de pacientes diabéticos causado no únicamente por oxidación sino que también pudo ser alterado por vías metabólicas tales como la relacionada con el sorbitol y las alteraciones de la aldosa reductasa en el ambiente interno de los cristalinicos de pacientes diabéticos. La RPMC ha sido estrechamente relacionada en los últimos años con la diabetes mellitus (Scheuner D., Kaufman; 2008); y se tiene evidencia que sugiere que esto puede jugar un papel importante en el daño a las células del cristalino cuando se están desarrollando las cataratas diabéticas debido a estrés osmótico (Mulhern M.L, et al.; 2006), el cual postula que al encontrarse en pacientes con niveles inadecuados de glucosa en sangre (hiperglucemia) se activará la vía de los polioles, por medio de la cual habrá una subsecuente activación de la enzima aldosa reductasa que causaría una acumulación de sorbitol dentro de las células epiteliales del cristalino, que induce estrés en el retículo endoplasmático, por lo cual llevaría a la activación de la RPMC (Levin L.A.; 2010). Nuestros hallazgos sugieren que la respuesta a proteínas mal conformadas puede jugar un importante papel no solo en el desarrollo de cataratas seniles sino que también en las cataratas asociadas a la diabetes mellitus. La RPMC puede estar activada por una posible acumulación de proteínas mal conformadas en el retículo endoplasmático de las fibras cristalinianas, causado tanto por daño oxidativo como por estrés relacionado al sorbitol. Esta respuesta posiblemente dispare diferentes mecanismos para aliviar el estrés en el RE de las células del cristalino (Naidoo N.; 2009). Es importante resaltar, que nuestro estudio fue realizado por primera vez en cristalinicos con cataratas de pacientes, previamente Engler et al., (2010) estudiaron la RPMC con muestras de pacientes con distrofia de Fuchs, el cual es una patología ocular, que se presenta en la córnea, sin embargo, encontraron que era posible que la RPMC también jugara un importante papel aun no resuelto en el mecanismo patogénico de esta distrofia.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Nuestro estudio tiene varias limitaciones: Primero, es importante entender que la obtención de muestras biológicas de cristalinos normales tiene implicaciones éticas. Así pues, nosotros únicamente incluimos a 3 donadores de cristalinos normales de personas sanas; sin embargo, existen estudios morfológicos previos que han usado microscopia electrónica de transmisión y que han usado un número similar de muestras para evaluar la ultraestructura de las cataratas (Al-Ghoul K.J., Lane C.W., Taylor V.L et al; 1996) (Al-Ghoul K.J., Nordgren R.K., Kuszak A.J. et al.; 2001). Nuestro tamaño de muestras con cataratas fue suficientemente grande para obtener resultados estadísticamente significativos. Segundo, empleamos dos técnicas diferentes con diferente sensibilidad para confirmar y validar nuestros resultados, tal y como han usado otros autores (Orzalesi N. et al.; 1994 y Ralph M. et al.; 1998). La sensibilidad de la técnica morfológica es limitada por el procesamiento del tejido. La inclusión del material es un elemento clave en este aspecto; una inclusión ideal del material necesita preservar la integridad del tejido y también mantener la inmunogenicidad. La técnica de parafina combinada con fluorocromos (inmunofluorescencia en parafina) tiene una sensibilidad limitada a cortes de 4 micras de espesor, pero las resinas como el glicol metacrilato (GMA) así como el LR-White para microscopía electrónica de transmisión, permite obtener cortes de 60 nm. Esto es probablemente por lo que nos permitió detectar mínimas cantidades de GRP78 y ATF6 en cristalinos normales usando inmuno-oro pero no detectamos nada cuando empleamos las técnicas de inmunohistoquímica con DAB e inmunofluorescencia sobre las mismas muestras pero procesadas con parafina, por lo que esto valida nuestros resultados (Arvid B. et al.; 1999, Terry M.M. et al.; 2009 y Bennet H. Stanley et al; 1976).



8

CONCLUSIÓN

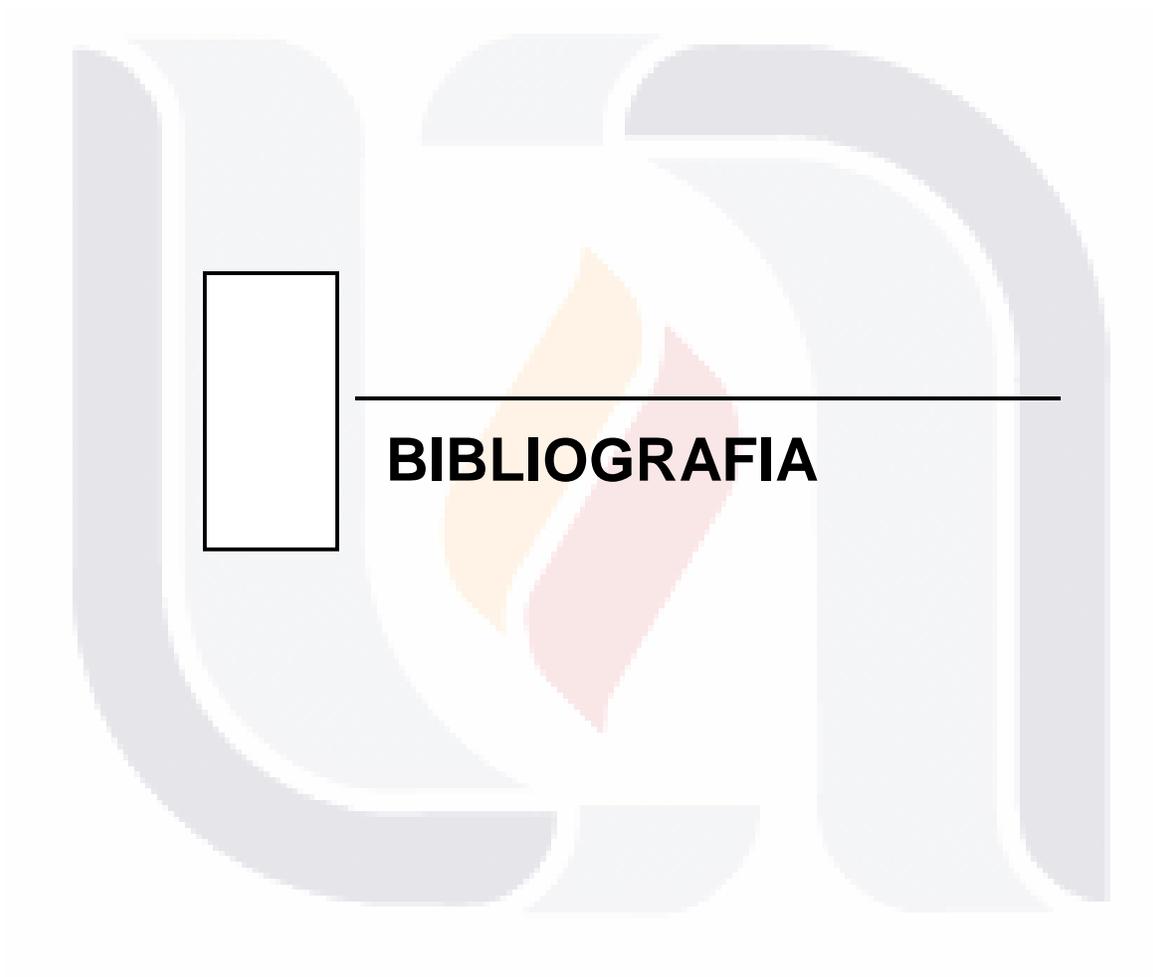
8. CONCLUSIÓN

Por medio de nuestro estudio podemos concluir que:

1. Existen cambios morfológicos entre los cristalinos sanos sin cataratas y los cristalinos con cataratas diabéticas o seniles.
2. En los cristalinos con cataratas se presenta el fenómeno de compactación de las fibras cristaliniánas, el cual se observa como la pérdida de organización, alineación e interdigitaciones entre estas fibras celulares.
3. En los cristalinos sanos sin cataratas de pacientes humanos se presenta una expresión constitutiva de los componentes de la RPMC, GRP78 y ATF6.
4. GRP78 y ATF6, dos de los componentes de la RPMC se encuentran detectados positivamente en tejidos de cristalinos con cataratas seniles y cataratas diabéticas de pacientes humanos por primera vez.
5. En los cristalinos con cataratas de los pacientes diabéticos hay un aumento en la presencia de GRP78 y ATF6, por lo se cree que es debido a una adición del daño metabólico (como estrés osmótico y productos finales de la glicosilación) al daño foto-oxidativo (luz solar) lo cual estaría activando la respuesta a proteínas mal conformadas de una manera más intensa y temprana que en las cataratas seniles.
6. Por todo lo anteriormente señalado se podría pensar que la RPMC podría ser importante para el proceso de cataratogénesis

GLOSARIO

Abreviatura	Significado
PTI	Fosfatidilinositol
IP3	Inositoltrifosfato
DAG	Diacilglicerol
GLUT	Transportadores de Glucos
MCG	Complejo mayor de histocompatibilidad
RD	Retinopatía diabética
MIP	Proteína intrínseca mayor
GRP78	Proteína regulada por la glucosa
Ire1	Proteína transmembranal cinasa/endoribonucleasa
ATF6	Factor de transcripción activado 6
ERSE	Elemento al estrés en el retículo endoplasmático
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
EKG	Electrocardiograma
PBS	Buffer de fosfato salino
BSA	Albumina sérica bovina
DAB	Diaminobencidina



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

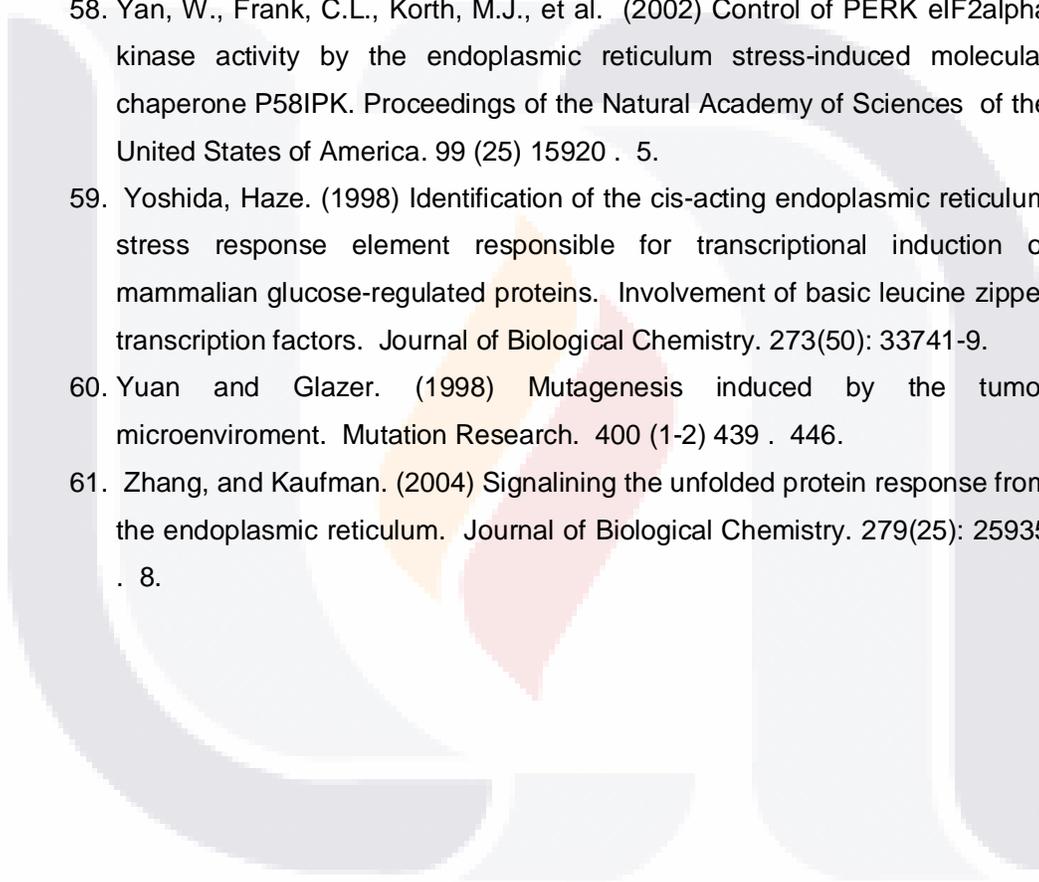
1. Al-Ghoul K.J., Lane C.W., Taylor V.L., et al. (1996) Distribution and type of morphological damage in human nuclear age-related cataracts. *Experimental Eye Research*. 62: 237 . 251
2. Al-Ghoul K.J., Nordgren R.K., Kuszak A.J. et al. (2001) Structural evidence of human nuclear fiber compaction as a function of ageing and cataractogenesis. *Experimental Eye Research*. 72: 199 . 214
3. Arvid B., Maunsbach & Bjorn A. Afzelius. (1999). *Biomedical Electron Microscopy Illustrated Methods and Interpretations*. Chapter 1. Micrograph Interpretation. Academic Press. 22 . 24
4. Bennett H. Stanley, Wyrick A. Dean, Lee Sarah W. and McNeill John H.. *Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains*. *Stain Technology*. Volume 5, 1976 number 2.
5. Bobrow, J.C. (2008) *Cristalino y Cataratas*. Anatomía y Bioquímica. Elsevier. 1a Edición: 5 . 16. España
6. Bonafonte, García. (2006) *Retinopatía Diabética*. Elsevier. Segunda edición. 273 pp. España.
7. Brewer and Diehl. (2000). PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *PNAS*; 97(23):12625-30.
8. Brewer, Hendershot et al. (1999) Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *PNAS*. 96(15):8505-10
9. Bron A.J., Brown N.A., et al. (1998) The lens and cataract in diabetes. *International Ophtalmology Clinics*. 38: 37 . 67
10. Campo P, Das et al. (2002) Translational regulation of cyclin D1 by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2). *Cell Growth and Differentiation*. 13(9):409-20.
11. Costello, M.J., Lane, C.W., Hatchell, D.L., Saloupis, P., Cobo, L.M., (1993) Ultrastructure of fiber cells and multicellular inclusions in experimental diabetes. *Investigative Ophtalmology & Visual Science*. 34(7): 2174 . 2185
12. Costello, M.J. et al., (2008) Ultrastructure analysis of damage to nuclear fiber cell membranes in advanced age-related cataracts from India. *Experimental Eye Research*. 87(2): 147 . 158

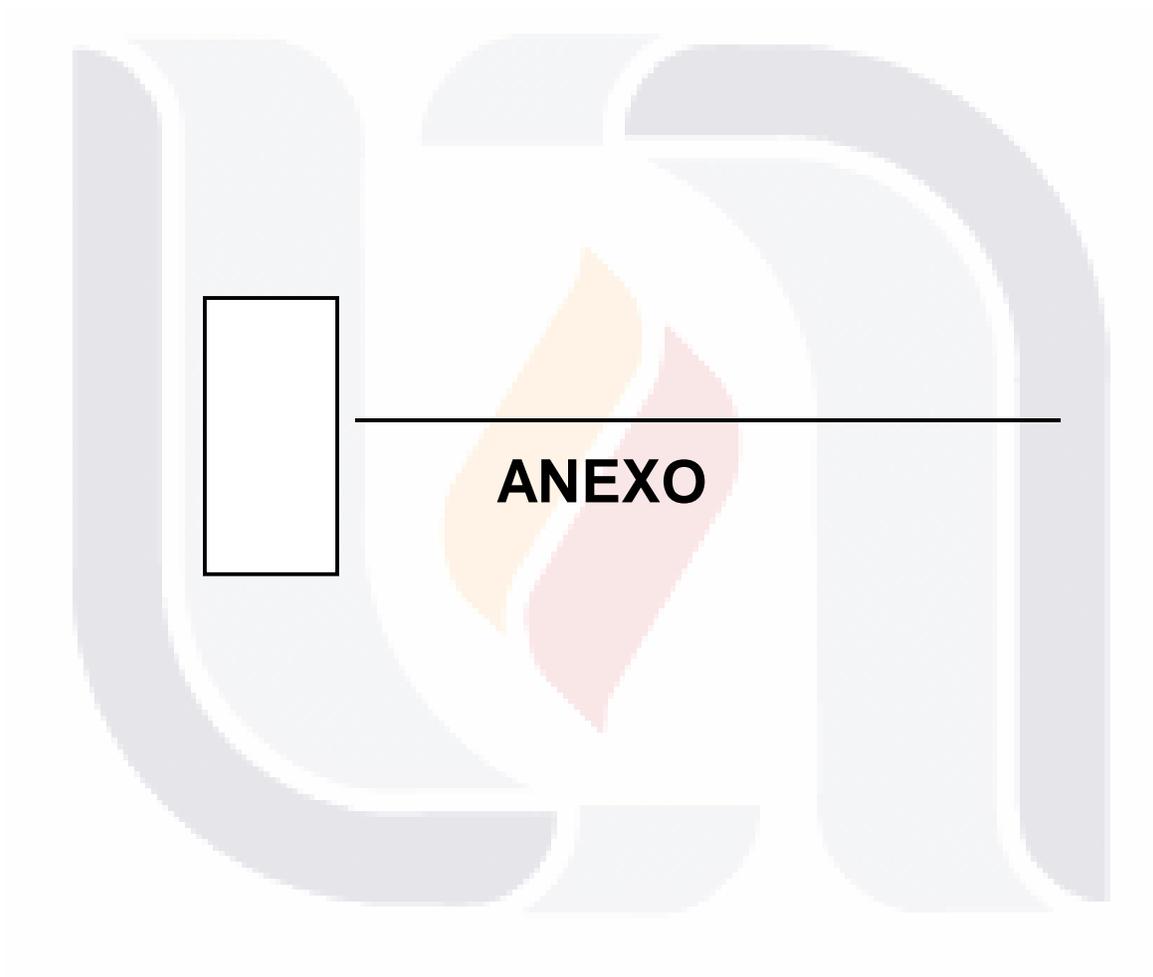
13. Devlin. 2000. Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas volumen 2. Reverté. Tercera edición. 1150 pp. España.
14. Dorairaj, S.J., Vatsala, V., Vijaya Kumar, J., Kesavai, R., Sucheethra, D.S. (2002) Morphometric and Histological Study of Human Cataract Lens. *Journal of the Anatomical Society of India*. 51(1): 14 . 17.
15. Elanchezhian R. (2012). Age-related cataracts: homocysteine coupled endoplasmic reticulum stress and suppression of Nrf2-dependent antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*. 200(1): 1 . 10.
16. Engler, C., Kelliher, C., Spitze A.R., Speck, C.L., Eberhart, C.G., Jun, A.S. (2010) Unfolded protein response in Fuchs endothelial corneal dystrophy: a unifying pathogenic pathway? *American Journal of Ophthalmology*. 149(2): 1 .
17. Firtina, Z., Danysh et al. (2009) Abnormal expression of collagen IV in lens activates the unfolded protein response resulting in cataract. *Journal of Biological Chemistry*. 285(51): 35872 . 35884.
18. Firtina, Z., Duncan, M.K. (2011) Unfolded Protein Response is activated during normal lens development. *Gene Expression Patterns*. 11: 135 . 143
19. Flores-Díaz, Higueta et al. (2004) A cellular UDP-glucose deficiency causes overexpression of glucose/oxygen-regulated proteins independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *Journal of Biological Chemistry*. 279(21):21724-31.
20. Freel, C.D., Al-Ghoul, J.K., Kuszak, J.R., Costello, M.J. (2003) Analysis of nuclear fiber cell compaction in transparent and cataractous diabetic human lenses by scanning electron microscopy. *BioMed Central Ophthalmology*. 3(1): 1 . 9
21. Garbin Fuentes y Pérez Chica. *Patología del Cristalino. Cataratas*. www.sepeap.org/archivos/libros/OFTALMOLOGIA
22. Gartner, Hiatt. (2008) *Texto Atlas de Histología*. McGraw Hill. 3ª edición. 574 pp. México.
23. Gething and Sambrook. (1992) Protein folding in the cell. *Nature*. 355(6355): 33 . 45.
24. Hodge EG, Witcher J.P. Satariano W. (1995) Risk factors for age-related cataracts. *Epidemiology Review*. 17: 336 . 346
25. Isselbacher, Braunwald et al. (1994) *Harrison: Principios de Medicina Interna*. Interamericana Mc Graw Hill. Décimo tercera edición. 3029 pp. México.

26. Jamora, Dennert. (1996) Inhibition of tumor progresión by supression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma BC/10ME. PNAS. 93(15):7690-4.
27. Jongebloed, W.L., Van der Want, J.J.L., Worst, J.G.F., Kalicharan, D. (1998) Stereoscopic Images of human cataractous lens fibers obtained with field emission scanning electron microscopy. Scanning Microscopy. 12(4) 653 . 665.
28. Kaufman, P.L., Alm, A. (2004) Fisiología del ojo. Aplicación clínica. Cristalino. Elsevier. 10ª edición: 830 pp. España
29. Kaufman, Scheuner. (2002) The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 3(6):411 . 421.
30. Lange, McPhee, Papadakis. (2008) Diagnostico clínico y tratamiento. McGraw Hill. Cuadragésima séptima edición. 1679 pp. México.
31. Lee, A.Y.W., Chung, S.M. (1999) Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. The FASEB Journal. 13: 23 . 30
32. LeRoith, Taylor. (2003) Diabetes Mellitus. McGraw Hill. Segunda edición. 1331 pp. México.
33. Levin, L.A., Albert, D.M. (2010) Ocular Disease, Mechanisms and Management. Lens. Elsevier. 4: 231 . 274
34. Liu, C.Y., Kaufman, R.J., (2003) The unfolded protein response. Journal of Cell Science. 116(10): 1861 . 1862
35. Ma Y, Hendershot L.M. (2004) The role of the unfolded protein response in tumor development: friend or foe? Nature Reviews Cancer. 4(12) 966 . 977.
36. Mellvile, Katze. (2000) P58IPK, a novel cochaperone containing tetratricopeptide repeats and a J-domain with oncogenic potential. CMLS. 57(2):311-22.
37. Mulhern, M.L., Madson, C.J., Danford, A., Ikesugi, K., Kador, P.F., Shinohara, T. (2006) The unfolded protein response in Lens Epthelial cells from galactosemic rat lenses. Investigative Ophtalmology & Visual Science. 47(9): 3951 . 3959.
38. Naidoo, N., (2009) Cellular Stress/The unfolded protein response: Relevance to sleep and sleep disorders. Sleep Medicine Reviews. 13(3): 195 . 204.
39. Orzalesi N., Migliavacca L., Miglior S. (1994) Subretinal neovascularization after naphthalene damage to the rabbit retina. Investigative Ophtalmology & Visual Science. 35: 696 . 705

40. Oyadomari, Mori. (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation*. 11(4): 381-9
41. Parker, Phan (2001) Identification of TFII-I as the endoplasmic reticulum stress response element binding factor ERSF: its autoregulation by stress and interaction with ATF6. *Molecular and Cellular Biology*. 21(9):3220 . 33.
42. Pollreisz, A., Schimdt-Erfurth, U. (2010) Diabetic Cataract-Pathogenesis, Epidemiology and Treatment. *Journal of Ophthalmology*. 20: 1 . 8.
43. Quiroz, Ochoa et al. (2004) *Retina, Diagnóstico y Tratamiento*. McGraw Hill Interamericana. Segunda edición. 617 pp. México.
44. Ralph Michael, Gijs F., Vrensen J.M., et al. (1998). Apoptosis in the rat lens after in vivo treshold dose ultraviolet irradiation. *Investigative Ophtalmology & Visual Science*. 39: 2681 . 2687.
45. Rao, Peel. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Letter*. 514(2):122.
46. Rosenberg, E.A. (2008) The visually impaired patient. *American family Physician*. 77 (10): 1431 . 1436
47. Ryan. (2009) *Retina*. Volumen 1. Marbán. Cuarta edición. 789pp. España.
48. Scheuner, D., Kaufman, R.J. (2008) The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with B-cell failure and diabetes. *Endocrine Reviews*. 29(3): 317 . 333.
49. Struck H.G., Heider C., Lautenschlager C. (2000). Changes in the lens epithelium of diabetic and non diabetic patients with various forms of opacities in senile cataract. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 216: 204 . 209
50. Taylor, V.L., Al-Ghoul, K.J., Lane, C.W. et al. (1996) Morphology of the Normal Human Lens. *Investigative Ophtalmology & Visual Science*. 37(6): 1396 . 1410
51. Terry M. Mayhewa, Christian Mühlfeldeb, Dimitri Vanheckeb, Matthias Ochs. (2009). A review of recent methods for efficiently quantifying immunogold and other nanoparticles using TEM sections through cells, tissues and organs. *Ann anat*. 191: 153 . 170
52. Ubeda and Habener. CHOP gene expresión in response to endoplasmic reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element.
53. Vaughan, Asbury. (1994) *Oftalmología General*. El Manual Moderno. Decima edición. 530 pp. México.

54. Wang, Harding et al. (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *The EMBO Journal*. 17(19):5708-17.
55. Wang, Lawson et al. (1996) Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Molecular and Cellular Biology* . 16(8):4273-80.
56. West S. (2007) Epidemiology of cataract; accomplishments over 25 years and future directions. *Ophtalm Epidemiology*. 14: 173 . 178
57. Wyngaarden y Smith. Cecil, *Tratado de Medicina Interna Vol. I*. Interamericana McGraw-Hill. Decimo octava edición. 2667 pp. México.
58. Yan, W., Frank, C.L., Korth, M.J., et al. (2002) Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (25) 15920 . 5.
59. Yoshida, Haze. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*. 273(50): 33741-9.
60. Yuan and Glazer. (1998) Mutagenesis induced by the tumor microenvironment. *Mutation Research*. 400 (1-2) 439 . 446.
61. Zhang, and Kaufman. (2004) Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 279(25): 25935 . 8.





CORREO DE ACEPTACIÓN DE ARTICULO DE INVESTIGACIÓN.

----- Mensaje original -----

Asunto:Your Submission, "Unfolded protein response (UPR) activation in cataracts"

Fecha:24 Feb 2014 14:24:29 +0000

De:Journal of Cataract and Refractive Surgery <jcrs@ASCRS.org>

Para:jventur@correo.uaa.mx

Ref.: Ms. No. JCRS-13-1058R1

Unfolded protein response (UPR) activation in cataracts

Journal of Cataract & Refractive Surgery

Dear Dr. Ventura.Juárez,

The reviewers and editor have accepted your (revised) manuscript Unfolded protein response (UPR) activation in cataracts(JCRS-13-1058R1) for publication in the journal. As soon as it is scheduled for a particular issue, you will receive typeset pages to check. Sincerely,

Nick Mamalis, MD

Editor

Journal of Cataract & Refractive Surgery

Torres-Bernal BE, Torres-Bernal LF, Gutiérrez-Campos R, Kershenovich Stalnikowitz D, Barba-Gallardo LF, Chayet AA and Ventura-Juárez J. Unfolded protein response (UPR) activation in cataracts. **Journal of Cataract and Refractive Surgery, in Press. (2014) Impact factor: 2.668**