

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Determinación De La Presencia y Expresión De Las Enzimas Geranylgeranyl Difosfato Sintasa, Farnesyl Difosfato Sintasa, Lanosterol Sintasa y Escualeno Sintasa En Cristalinos Humanos Con Catarata Senil

Autor

Diego Fernando Durán Guzmán

Universidad Nacional De Colombia
Facultad De Medicina, Departamento De Oftalmología
Bogotá D.C., Colombia
2022

Determinación De La Presencia y Expresión De Las Enzimas Geranylgeranyl Difosfato Sintasa, Farnesyl Difosfato Sintasa, Lanosterol Sintasa y Escualeno Sintasa En Cristalinios Humanos Con Catarata Senil

Diego Fernando Durán Guzmán

Trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Oftalmología

Director:
Marcel Yecid Avila Castañeda, M.D.

Línea de Investigación:
Vía metabólica del Lanosterol en catarata senil de cristalinios humanos

Universidad Nacional De Colombia
Facultad De Medicina, Departamento De Oftalmología
Bogotá D.C., Colombia
2022

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Diego Fernando Durán Guzmán

Fecha 02/02/2022

Resumen

Determinación De La Presencia y Expresión De Las Enzimas Geranylgeranyl Difosfato Sintasa, Farnesyl Difosfato Sintasa, Lanosterol Sintasa y Escualeno Sintasa En Cristalinos Humanos Con Catarata Senil

Se desconoce con claridad la fisiopatología exacta por la cual se forman las cataratas relacionadas con la edad. Se han investigado múltiples relaciones entre la biosíntesis del lanosterol y la formación de cataratas. En nuestro estudio se realizó un estudio de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real de las enzimas Farnesyl sintasa, Geranyl sintasa, Lanosterol sintasa y Escualeno sintasa en un cristalino transparente de control y dos cristalinos con catarata senil de diferentes grados de opacidad. En los resultados fue posible evidenciar una diferencia significativa en la expresión relativa de las enzimas Farnesyl sintasa, Geranyl sintasa y Escualeno Sintasa siendo mayor en las muestras 1 y 2 de cristalinos con opacidad nuclear con respecto al cristalino control transparente. Los hallazgos sugieren una modificación patológica en el funcionamiento de la vía metabólica del colesterol bifurcándose hacia un aumento en la expresión de la enzima Geranyl difosfato sintasa. Esta desviación resulta importante al estar este compuesto implicado en el proceso de prenilación de proteínas, lo cual podría explicar la aglomeración de proteínas en cristalinos humanos, conllevando a la opacificación del cristalino con la edad.

Palabras clave: Catarata Senil, Lanosterol Sintasa, Escualeno Sintasa, Farnesyl Sintasa, Geranyl Sintasa.

Abstract

Determination of the presence and expression of the Enzymes Geranylgeranyl biphosphate Synthase, Farnesyl biphosphate Synthase, Lanosterol Synthase and Squalene Synthase in Human Lenses with Senile Cataract.

The exact pathophysiology by which age-related cataracts develop is not clearly known. Multiple relationships between lanosterol biosynthesis and cataract formation have been investigated. In our study, a real-time polymerase chain reaction assay of the enzymes Farnesyl synthase, Geranyl synthase, Lanosterol synthase and Squalene synthase was performed on a transparent control lens and two senile cataractous lenses with different degrees of opacity. In the results it was possible to evidence a significant difference in the relative expression of the enzymes Farnesyl synthase, Geranyl synthase and Squalene Synthase, being higher in samples 1 and 2 of lenses with nuclear opacity compared to the control lens. These findings suggest a pathological modification in the functioning of the cholesterol metabolic pathway, deviating towards an increase in the expression of the enzyme Geranyl diphosphate synthase. This deviation is important as this compound is involved in the process of protein prenylation, which could explain the agglomeration of proteins in human lenses, leading to lens opacification with age.

Palabras clave: Senile Cataract, Lanosterol Synthase, Squalene Synthase, Farnesyl Synthase, Geranyl Synthase.

1. INTRODUCCIÓN

La catarata es la opacificación del lente intraocular natural del globo ocular, el cual tiene como función enfocar la luz que ingresa a través de la córnea y la pupila hacia la retina neurosensorial. Esta opacificación del cristalino genera una pérdida progresiva de la agudeza visual además de provocar síntomas visuales que deterioran progresivamente la calidad de vida del paciente afectado. A nivel mundial las cataratas son la causa número uno de ceguera prevenible y tratable. Hasta la fecha no existe ningún tratamiento no quirúrgico eficaz que permita el retraso, detención o reversión de la progresión de la enfermedad, por lo cual el único tratamiento usado por los oftalmólogos a nivel mundial es la cirugía de catarata. ¹

En América Latina, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estimó que la catarata asociada con la edad es la principal causa de pérdida de visión y ceguera, donde su proporción de prevalencia varía entre un 39 y 50% dependiendo de la urbanización y el desarrollo económico. Se estima que en Colombia la prevalencia de ceguera oscila entre el 0.7%, lo cual implica que, por cada millón de habitantes, 7.000 personas se encuentran ciegas, entre este porcentaje aún una gran proporción está vinculada con el desarrollo de catarata relacionada con la edad, especialmente en los sectores del país con menor desarrollo económico y por ende menor acceso a los servicios de salud. ²

Aproximadamente 3 millones de cirugías de catarata son realizadas anualmente en Estados Unidos, siendo este el procedimiento quirúrgico más realizado a nivel mundial de manera ambulatoria. El costo médico directo relacionado con el tratamiento de las cataratas en Estados Unidos, el cual incluye consultas por especialista, cirugía y medicamentos prescritos es de aproximadamente 6.8 millones de dólares anualmente. Existe una diferencia importante en la tasa de cirugías de catarata realizadas por cantidad de habitantes entre los países desarrollados y los países en desarrollo, siendo en los primeros un aproximado de 10.000 procedimientos por millón de habitantes por año, en China es de 300 a 400 por millón y en los países en vía de desarrollo puede ser tan bajo como 50 cirugías por millón de habitantes anualmente. Para 1999 la OMS lanzó el programa Visión 2020: El derecho por la visión, enfocado a mejorar las condiciones de tratamiento de la catarata especialmente a nivel de países en vía de desarrollo. Fue posible determinar que el número de cirugías realizadas a nivel mundial se debía triplicar para mantener un equilibrio entre oferta y demanda, con una meta de 3000 cirugías por millón de habitantes anualmente, una meta que ya pasados 20 años desde su inicio, aún no ha sido posible cumplirse en muchos países. ¹

Se desconoce con claridad la fisiopatología exacta por la cual se forman las cataratas relacionadas con la edad. A medida que el cristalino envejece aumenta su masa y espesor, disminuyendo su poder acomodativo. Al parecer ocurren modificaciones químicas y proteólisis de las proteínas cristalinas, llevando a la formación de agregados proteicos de alto peso molecular. Estos agregados pueden volverse lo suficientemente grandes como para causar fluctuaciones importantes en el índice refractivo del cristalino en estos puntos focales, aumentando la dispersión de la luz y disminuyendo su transparencia. Las modificaciones químicas en las proteínas nucleares también aumentan la opacidad del

cristalino, haciendo que se torne amarillo o marrón progresivamente al avanzar la edad del paciente ¹. Existen múltiples hallazgos que indican que este proceso resulta de un

desequilibrio multifactorial de diferentes vías de metabolismo de las células del cristalino, siendo de particular importancia la vía metabólica del lanosterol, vinculándose con la formación de catarata de tipo senil en modelos animales y en cristalinos humanos ³⁻⁷. Además se han encontrado otros cambios en cristalinos sometidos a envejecimiento como lo son concentraciones disminuidas de glutatión y potasio, además de aumento de concentraciones de sodio y calcio en el citoplasma celular ¹.

El propósito del presente estudio es investigar más a fondo los cambios en la actividad de enzimas clave en la vía metabólica del lanosterol en cristalinos humanos con catarata relacionada con la edad en comparación con cristalinos sin desarrollo de opacidades. Particularmente determinar el nivel de actividad de las enzimas Geranylgeranyl PP sintasa, Farnesyl sintasa y Escualeno sintasa, este hallazgo es un paso esencial en la comprensión de la fisiopatología de la formación de opacidades en el cristalino relacionadas con la edad, permitiendo entender mejor los procesos metabólicos en desequilibrio y dando posibilidades terapéuticas no quirúrgicas en un futuro

2. JUSTIFICACIÓN

La opacificación del cristalino relacionada con la edad es a nivel mundial la causa número uno de ceguera prevenible y tratable. Hasta la fecha no existe ningún tratamiento no quirúrgico eficaz que permita el retraso, detención o reversión de la progresión de la enfermedad, por lo cual el único tratamiento usado por los oftalmólogos a nivel mundial es la cirugía de catarata ¹.

En América Latina, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estimó que la catarata asociada con la edad es la principal causa de pérdida de visión y ceguera, donde su proporción de prevalencia varía entre un 39 y 50% dependiendo de la urbanización y el desarrollo económico. Se estima que en Colombia la prevalencia de ceguera oscila entre el 0.7%, lo cual implica que, por cada millón de habitantes, 7.000 personas se encuentran ciegas, entre este porcentaje aún una gran proporción está vinculada con el desarrollo de catarata relacionada con la edad, especialmente en los sectores del país con menor desarrollo económico y por ende menor acceso a los servicios de salud. ²

A pesar de conocer el mecanismo patológico macroscópico por el cual se forman las opacidades en el cristalino, se desconocen las vías moleculares específicas alteradas que conllevan a este desenlace. Una de las vías de especial importancia en la fisiopatología de la formación de opacidades del cristalino es la vía metabólica del lanosterol, la cual se ha encontrado directamente responsable tanto de la formación de cualquiera de los tres tipos principales de catarata senil (cortical, nuclear o subcapsular posterior) en modelos animales y en cristalinos humanos. Se ha encontrado que al inhibir enzimas clave en la síntesis del lanosterol se genera como consecuencia la aceleración de formación de opacidades del cristalino, además se ha encontrado que la estimulación de la vía metabólica de lanosterol incluyendo el tratamiento de cristalinos con catarata senil en modelos animales alivia la agregación de proteínas y las opacidades, pudiendo ser un blanco atractivo en el tratamiento, prevención o retraso de la formación de opacidades ³⁻⁷.

Gracias al estudio realizado por la Dra. Laura Paola Reyes y el Dr. Marcel Yecid Ávila fue posible llevar estas hipótesis sobre la importancia de la actividad de la enzima lanosterol sintasa (2,3 oxidoescualeno ciclase) en la formación de opacidades de cristalino relacionadas con la edad en cristalinos humanos. La particularidad de este estudio radica en la excelente cadena de conservación de los especímenes, siendo extraídos en su totalidad sin fragmentarlos o someterlos a cambios físicoquímicos que pudieran alterar los resultados. El hallazgo más importante fue el nivel paradójicamente elevado de enzima lanosterol sintasa la cual estaba positivamente correlacionada con el grado de las cataratas, pero también se encontraba elevada en los cristalinos de control ⁶. Es a partir de estos hallazgos que se despierta el interés en profundizar el estudio de la vía del lanosterol, particularmente en un proceso enzimático clave en puntos más tempranos de la vía que determinan la desviación de la vía metabólica hacia un proceso patológico de prenilación de proteínas, el cual podría explicar la agregación de complejos proteicos en el citoplasma de las células y dar un paso más adelante en esclarecer la importancia de esta vía metabólica en la fisiopatología de las cataratas seniles, siendo incluso un potencial blanco terapéutico en el posible tratamiento no quirúrgico de esta prevalente causa de ceguera a nivel mundial

3. MARCO TEÓRICO

Catarata

La catarata es la causa número uno de pérdida visual en el mundo. La OMS estima que aproximadamente 18 millones de personas se encuentran en estado de ceguera debido a esta condición, la cual se estima que causa un 48% de los casos de ceguera en el mundo. Además, se estima que aproximadamente el 33% de la población mundial experimenta algún grado de deterioro visual debido a este trastorno. Es importante destacar que la gran mayoría de casos de ceguera debido a esta patología, incluso hasta un 90%, se encuentran en países en vía de desarrollo ¹.

Se entiende que la formación de cataratas puede suceder por múltiples etiologías, tales como traumas, inflamación, diabetes mellitus, desequilibrios hidroelectrolíticos, post-quirúrgicos y senescencia, entre otros. Las cataratas relacionadas con la edad usualmente se desarrollan de manera lenta con un deterioro gradual en la visión que no puede ser corregido adecuadamente con anteojos. La catarata senil es el tipo más común de catarata y su fisiopatología no se encuentra aun totalmente comprendida ¹.

En las cataratas seniles se evidencian una serie de factores importantes que involucran la compactación y endurecimiento del material central del lente, proceso llamado esclerosis nuclear, a medida que nuevas capas de fibras corticales continúan proliferando con el tiempo. Además, se evidencian cambios anormales en las proteínas lenticulares llamadas "cristalinas" lo cual resulta en su alteración química y estructural y una pérdida de la transparencia de las mismas. Esta alteración progresa con el tiempo adquiriendo una pigmentación que inicia en el color amarillo y progresa hacia un color marrón, brunescente o negro. Al grado de opacificación y coloración de la opacidad se le atribuye una escala específica dada por el "sistema de clasificación de opacidades lenticulares III" o LOCS III por sus siglas en inglés, la cual es una escala subjetiva con imágenes de referencia para cada grado de opacificación ¹.

Las cataratas seniles pueden ser de localización nuclear, de corteza anterior o subcapsulares posteriores. Se presentan usualmente en personas mayores de 50 años con síntomas como visión borrosa a la distancia o en cercanía según la localización de la opacidad, "glares" o halos alrededor de las luces con dificultad para ver con detalle los objetos sometidos a luz de alta intensidad, dificultad para ver en bajas condiciones de luz, pérdida de sensibilidad al contraste, pérdida de la habilidad para discernir colores y aumento de dificultad para la lectura ¹.

En la actualidad el manejo de la opacidad de cristalino se reserva únicamente al procedimiento quirúrgico, el cual consiste en la extracción del núcleo y corteza del cristalino de manera manual o asistida por ultrasonido (facoemulsificación) a través de un orificio en la cápsula anterior del cristalino, dejando intacta la cápsula posterior y el resto del saco capsular con el fin de servir estos últimos de soporte para la colocación de un implante de lente intraocular fabricado a partir de materiales sintéticos no antigénicos y calculados previamente con el fin de proveer una aproximación a la refracción que proveía el cristalino sano. A pesar de haber un interés amplio en la investigación de un posible manejo no

quirúrgico para tratar esta entidad, debido a los altos costos que genera su tratamiento y la dificultad para la cobertura del tratamiento quirúrgico en zonas remotas o países en vía de desarrollo, aún no existe hasta la fecha un tratamiento que permita el retraso en la progresión o reversión de la opacidad en cristalinos humanos.

Proteínas del cristalino

Aproximadamente el 33 al 35% del peso del cristalino es constituido por proteínas. Se caracterizan según su hidrosolubilidad. Las proteínas hidrosolubles constituyen el 80% del total de la masa del tejido en los pacientes jóvenes. A su vez, las proteínas hidrosolubles se subdividen en proteínas cristalinas alfa, beta y gamma ⁸.

Las proteínas alfa cristalinas hidrosolubles son las proteínas más abundantes, clasificadas dentro de las pequeñas proteínas de choque térmico. Estas son más largas y usualmente forman complejos proteicos con otras proteínas cristalinas, uniéndose a proteínas parcialmente desnaturadas, previniendo su completa desnaturación e insolubilización. Las proteínas alfa cristalinas se encuentran formadas por subunidades A y B ^{1,8}.

Las beta cristalinas son un conjunto de polipéptidos que se pueden asociar entre sí formando dímeros y complejos de alto orden. Estos pueden dividirse respecto a su peso molecular en alto peso y bajo peso.

Las gamma proteínas cristalinas son las más pequeñas del grupo de las hidrosolubles y constituyen solo un 15% del total. Característicamente no suelen asociarse entre sí o con otras proteínas, al igual que las beta cristalinas, están altamente conservadas evolutivamente en su estructura en diferentes vertebrados ⁸.

Las proteínas cristalinas proveen la transparencia del cristalino y por ende sus propiedades refractivas únicas. Cualquier tipo de injuria o daño físico o químico sea genético, congénito, por estrés oxidativo, metabólico o por luz ultravioleta, inducen sobre ellas la agregación y formación de complejos, lo cual hace perder su propiedad de transparencia y confiere al cristalino una zona de opacidad, además de la pérdida de su función refractiva ¹.

Las proteínas no hidrosolubles del cristalino incluyen proteínas estructurales y de citoesqueleto, al igual que en otros tipos celulares estas últimas contienen microfilamentos y microtúbulos, siendo particular la evidencia de otros dos filamentos intermedios, algunos compuestos de cimentina y otros de faquinina y filensina, los cuales son únicos y específicos del cristalino.

Cualquier alteración genética que modifique la estructura de estas proteínas conlleva también a la formación de agregaciones de proteínas y por ende opacificación del cristalino. Otra fracción de proteínas encontradas en el cristalino son las insolubles en urea, donde se encuentran las proteínas de membrana. La mitad de estas es constituida por la proteína intrínseca mayor (MIP o aquaporina 0), con una función esencial en los canales de agua y el equilibrio hidroelectrolítico del cristalinos ^{1,8}.

Lanosterol y la vía metabólica

El lanosterol es una molécula intermedia de la biosíntesis del colesterol a partir del escualeno. La elaboración del lanosterol por medio de múltiples catálisis enzimáticas provee la estructura nuclear de los esteroides, siendo la 14-demetilación por CYP51 la que eventualmente provee la formación de colesterol ⁹.

El precursor principal e inicial en la vía metabólica del lanosterol es la Acetil-Coenzima A, la cual es transformada a 3-hidroxi-3-metilglutaryl-Coenzima A y por medio de varios pasos catalíticos enzimáticos es transformada a Geranyl difosfato y Farnesyl difosfato. Es en este punto de la vía metabólica que evidenciamos dos potenciales desviaciones, una patológica donde habría actividad de la Geranylgeranyl difosfato sintasa convirtiendo el Farnesyl difosfato en Geranylgeranyl difosfato; y la dirección fisiológica de la formación de escualeno por medio de la escualeno sintasa a partir del Farnesyl difosfato que en última instancia sintetizará el lanosterol ⁹.

Se han investigado múltiples relaciones entre la biosíntesis del lanosterol y la formación de cataratas, desde la inhibición de la lanosterol sintasa (2,3 oxidoescualeno ciclasa) en modelos animales de perros por medio de lesiones tóxicas y evidenciando el rápido desarrollo de opacidades de cristalino ^{4,7}. Se han realizado estudios en ratas donde mutaciones hipo mórficas en la lanosterol sintasa y la farnesil difosfato farnesil transferasa 1, los cuales produjeron disminución de los niveles de colesterol en el cristalino, lo que resultó en formación de opacidades. Análisis genéticos en familias con historia de susceptibilidad para la formación de cataratas congénitas evidenciaron la presencia de mutaciones homocigóticas en el gen de la lanosterol sintasa en el cromosoma 21, las cuales afectaron residuos de aminoácidos conservados y alteraron la función catalítica de la lanosterol sintasa. Por otra parte, se han realizado estudios in vitro que demostraron que la utilización del lanosterol previene la formación de agregados proteicos intracelulares en cristalinos con mutaciones en las proteínas cristalinas, incluso disminuyendo significativamente los agregados preformados de proteínas, mientras que estudios in vitro de cristalinos de conejo e in vivo en perros con catarata reportaron reducción en la severidad de las opacidades y aumento de la transparencia de los cristalinos ^{3,5,10}.

La prenilación de proteínas consiste en la adición de moléculas hidrofóbicas a una proteína o a un compuesto químico. Este proceso es de gran importancia en la interacción proteína-proteína y proteína-membrana celular, sirviendo como adhesivo molecular. Se conoce poco de la implicación fisiológica de la prenilación de proteínas en el organismo, proceso que al parecer ocurre en múltiples sistemas orgánicos con muy pobre conocimiento sobre sus repercusiones. Es posible deducir que este proceso podría estar mediando una porción importante de la agregación de proteínas cristalinas en el proceso fisiopatológico del desarrollo de catarata en cristalinos humanos con disfunción de la vía metabólica del lanosterol ¹¹.

4. OBJETIVOS

a. GENERAL

Determinar y analizar la presencia de las enzimas Geranylgeranyl difosfato sintasa, Farnesyl difosfato sintasa, Lanosterol sintasa y Escualeno sintasa en cristalinios humanos con catarata comparadas con cristalinios humanos sanos.

b. ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa en los cristalinios humanos con catarata
- Medir el nivel de expresión de la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa en los cristalinios humanos con catarata
- Comparar las mediciones de la enzima geranylgeranyl PP sintasa de los cristalinios humanos con catarata contra las mediciones de cristalinios sanos
- Determinar la presencia de la enzima escualeno sintasa en los cristalinios humanos con catarata
- Medir el nivel de expresión de la enzima escualeno sintasa en los cristalinios humanos con catarata
- Comparar las mediciones de la enzima escualeno sintasa de los cristalinios humanos con catarata contra las mediciones de cristalinios sanos
- Determinar la presencia de la enzima Farnesyl difosfato sintasa en los cristalinios humanos con catarata
- Medir el nivel de expresión de la enzima Farnesyl difosfato sintasa en los cristalinios humanos con catarata
- Comparar las mediciones de la enzima Farnesyl difosfato sintasa de los cristalinios humanos con catarata contra las mediciones de cristalinios sanos
- Determinar la presencia de la enzima Lanosterol sintasa en los cristalinios humanos con catarata
- Medir el nivel de expresión de la enzima Lanosterol difosfato sintasa en los cristalinios humanos con catarata
- Comparar las mediciones de la enzima Lanosterol difosfato sintasa de los cristalinios humanos con catarata contra las mediciones de cristalinios sanos

5. METODOLOGÍA

Fuero recolectados dos cristalinos humanos con catarata extraídos por medio de la técnica de extracción extracapsular manual de cristalino durante la cirugía de catarata. Fue recolectado para análisis el cristalino transparente de un paciente masculino de 28 años con muerte traumática, con previa autorización de entidad de medicina legal de la ciudad de Bogotá D.C.

Posteriormente fueron analizados en laboratorio especializado de biología molecular por medio de técnica de reacción de cadena de polimerasa en tiempo real con expresión relativa a proteína de control beta actina.

Análisis y procesamiento de datos.

6. Descripción de la intervención

1. Previo consentimiento informado de uso de material de cristalino para estudio de histopatología (ya incluido en el consentimiento informado del procedimiento quirúrgico), se recolectaron dos cristalinos humanos que cumplieron con los criterios de inclusión.
2. Almacenamiento de los cristalinos en medio de conservación RNAssist a -70 grados.
3. Previa autorización de entidad de medicina legal de la ciudad de Bogotá DC se recolectó un cristalino transparente de control de un paciente masculino de 28 años de edad.
4. Se almacenó la muestra de cristalino en medio de conservación RNAssist a -70 grados.
5. Procesamiento de muestra en laboratorio molecular especializado para estudio de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.
6. Análisis estadístico de fluorescencia y resultado de pruebas.
7. Tabulación, gráficas y análisis de resultados.

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional descriptivo.

6.2. MUESTRA

Dos cristalinos con catarata extraídos mediante la técnica de cirugía de catarata extracapsular manual convencional o por pequeña incisión por indicación médica, independiente de su grado y tipo de opacidad.

Muestra 1: Cristalino de paciente masculino de 73 años con catarata NO4NC4

Muestra 2: Cristalino de paciente femenina de 84 años con catarata NO6NC6

Control: Paciente masculino de 28 años sin antecedentes de importancia, cristalino sin evidencia de opacidades

6.3. GRUPOS

1. Pacientes con catarata con indicación de tratamiento quirúrgico

6.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Podrán ser objeto de esta investigación los pacientes que cumplan todo lo siguiente:

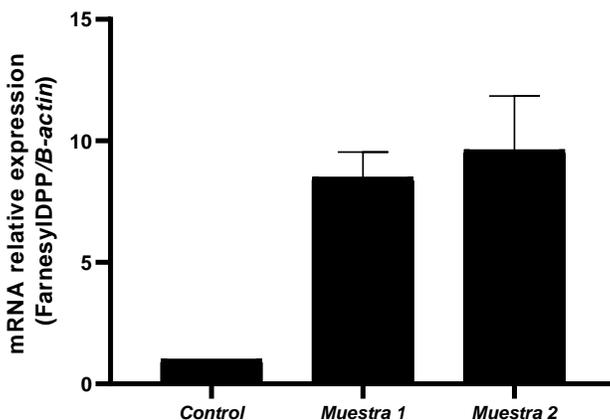
- Pacientes mayores de 18 años
- Pacientes con catarata de tipo relacionada con la edad que se sometan a cirugía de catarata por la técnica extracapsular manual.

Se excluirán los siguientes pacientes

- Pacientes con patología psiquiátrica que puedan limitar su seguimiento
- Menores de edad
- Pacientes con cataratas de cualquier tipo que no sea senil o en quienes se encuentren etiologías mixtas con comorbilidades sistémicas u oftalmológicas que puedan conllevar a una etiología mixta.
- Pacientes con catarata de tipo relacionada con la edad que se sometan a cirugía de catarata por técnica de facoemulsificación.

7. RESULTADOS

El análisis de la expresión relativa de la enzima Farnesyl difosfato sintasa para la muestra 1 evidenció un aumento relativo de 8.9 veces con base a la expresión relativa de la muestra control, mientras que para la muestra 2 evidenció un aumento relativo de 9.61 como se muestra en la gráfica 1 y tabla 1.



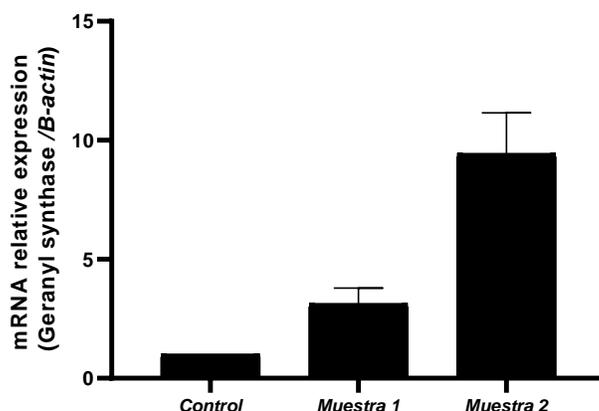
Gráfica 1. Expresión relativa de ARN mensajero de la enzima Farnesyl difosfato sintasa/Beta actina en cristalinos de control, muestra 1 y muestra 2.

	Farnesyl DPP	Farnesyl DPP	Farnesyl DPP	mean	B-actin	B-actin	B-actin	mean
PCR efficiency	1,9800				1,9900			
Ct values	Ct target A	Ct target B	Ct target C	Ct target	Ct ref. A	Ct ref. B	Ct ref. C	Ct reference
Control	30,68	32,02	32,16	31,62	22,69	21,49	21,89	22,02
Muestra 1	27,70	28,64	29,24	28,52688612	23,13	20,92	22,07	22,04
Muestra 2	28,56	29,22	28,78	28,85525391	23,05	22,1	22,28	22,48

mean fold change			
fold of control A	fold of control B	fold of control C	fold of control
1	1	1	1
10,38580713	6,779496107	8,306865202	8,490722814
5,45537777	10,27599631	13,11226507	9,614546382

Tabla 1. Expresión relativa de ARN mensajero de la enzima Farnesyl difosfato sintasa/Beta acina en cristalinos de control, muestra 1 y muestra 2.

El análisis de expresión relativa de la enzima Geranylgeranyl difosfato sintasa para la muestra 1 evidenció un aumento relativo de 3.13 veces con base a la expresión relativa de la muestra control, mientras que para la muestra 2 evidenció un aumento relativo de 9.43 como se muestra en la gráfica 2 y tabla 2.



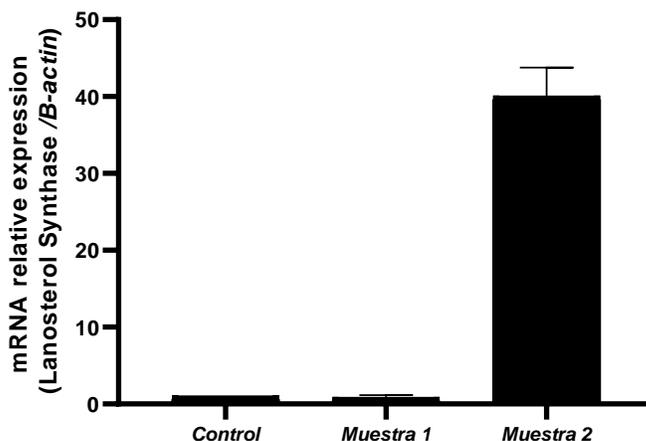
Gráfica 2. Expresión relativa de ARN mensajero de la enzima Geranylgeranyl difosfato sintasa/Beta actina en cristalinicos de control, muestra 1 y muestra 2.

PCR efficiency	G. syntase			mean	B-actin			mean
	Ct target A	Ct target B	Ct target C		Ct ref. A	Ct ref. B	Ct ref. C	
1,9870					1,9900			
Ct values	Ct target A	Ct target B	Ct target C	Ct target	Ct ref. A	Ct ref. B	Ct ref. C	Ct reference
Control	29,88	29,39	28,76	29,34	22,69	21,49	21,89	22,02
Muestra 1	28,17	27,69	27,43	27,76	23,13	20,92	22,07	22,04
Muestra 2	26,72	26,50	26,54	26,59	23,05	22,1	22,28	22,48

mean fold change			
fold of control A	fold of control B	fold of control C	fold of control
1	1	1	1
4,396386046	2,175346393	2,820958629	3,130897023
11,24354173	11,07073958	6,005538629	9,43993998

Tabla 2. Expresión relativa de ARN mensajero de la enzima Geranylgeranyl difosfato sintasa/Beta actina en cristalinicos de control, muestra 1 y muestra 2.

El análisis de expresión relativa de la enzima Lanosterol sintasa para la muestra 1 evidenció una disminución relativa de 0.80 veces con base a la expresión relativa de la muestra control, mientras que para la muestra 2 evidenció un aumento relativo de 40.00 como se muestra en la gráfica 3 y tabla 3.



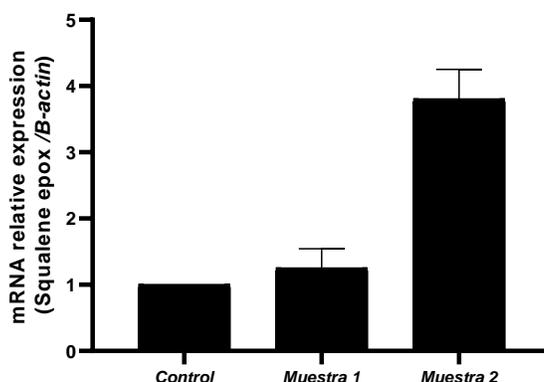
Gráfica 3. Expresión relativa de ARN mensajero de la enzima Lanosterol sintasa/Beta actina en cristalinos de control, muestra 1 y muestra 2.

PCR efficiency	L. synthase			mean	B-actin			mean
	1,9800				1,9900			
Ct values	Ct target A	Ct target B	Ct target C	Ct target	Ct ref. A	Ct ref. B	Ct ref. C	Ct reference
Control	37,80	37,32	37,42	37,51323244	22,69	21,49	21,89	22,02
Muestra 1	38,19	39,94	37,26	38,46217325	23,13	20,92	22,07	22,04
Muestra 2	32,67	32,37	32,71	32,58313083	23,05	22,1	22,28	22,48

fold of control A	fold of control B	fold of control C	mean fold change fold of control
1	1	1	1
1,040799501	0,113097856	1,257674019	0,803857125
42,70381114	44,72345688	32,59918784	40,00881862

Tabla 3. Expresión relativa de ARN mensajero de la enzima Lanosterol sintasa/Beta actina en cristalinos de control, muestra 1 y muestra 2.

El análisis de expresión relativa de la enzima Escualeno sintasa para la muestra 1 evidenció un aumento relativo de 1.25 veces con base a la expresión relativa de la muestra control, mientras que para la muestra 2 evidenció un aumento relativo de 3.80 como se muestra en la gráfica 4 y tabla 4.



Gráfica 4. Expresión relativa de ARN mensajero de la enzima Escualeno sintasa/Beta actina en cristalinos de control, muestra 1 y muestra 2.

PCR efficiency	S. epox			mean	B-actin			mean
	1,9800				1,9900			
Ct values	Ct target A	Ct target B	Ct target C	Ct target	Ct ref. A	Ct ref. B	Ct ref. C	Ct reference
Control	35,55	39,58	35,76	36,96364498	22,69	21,49	21,89	22,02
Muestra 1	36,19	38,12	35,87	36,72765995	23,13	20,92	22,07	22,04

Muestra 2	34,33	38,01	34,12	35,48543132	23,05	22,1	22,28	22,48
------------------	-------	-------	-------	-------------	-------	------	-------	-------

16

fold of control A	fold of control B	fold of control C	mean fold change fold of control
1	1	1	1
0,874155201	1,829023785	1,049930091	1,251036359
2,949107517	4,459329669	4,009439013	3,805958733

Tabla 4. Expresión relativa de ARN mensajero de la enzima Escualeno sintasa/Beta actina en cristalinos de control, muestra 1 y muestra 2.

8. DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos sugieren una modificación patológica en el funcionamiento de la vía metabólica del colesterol en el punto de bifurcación hacia un aumento en la expresión relativa de la enzima Geranylgeranyl difosfato sintasa clara en los dos grados de opacidades evaluados, mientras las enzimas Escualeno sintasa y Lanosterol sintasa, responsables de la formación de lanosterol y colesterol como productos finales se encontraron ligeramente elevadas y disminuídas en el grado de opacidad intermedio respectivamente, mientras que se elevaron significativamente en el grado de opacidad avanzado. Es posible sugerir una desviación de la vía hacia la formación de Geranylgeranyl difosfato, el cual es sustrato importante en el proceso de prenilación de proteínas, lo cual podría estar relacionado en la fisiopatología de la aglomeración de proteínas en cristalinos humanos, explicando la formación de cataratas seniles.

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con los principios establecidos en Declaración de Helsinki; Reporte Belmont; Pautas CIOMS; GPC/ICH) y en la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993: por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, Título II: de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo I: de los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos: en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar (Artículo 5) y la Resolución 2378 de (Por la cual se adoptan las Buenas Prácticas Clínicas para las instituciones que conducen investigación con medicamentos en seres humanos, y debido a que esta investigación se consideró como: Artículo 11 (de la Resolución 008430/93): Investigaciones con riesgo mayor que el mínimo: Son aquellas en que las probabilidades de afectar al sujeto son significativas, entre las que se consideran: estudios radiológicos y con microondas, estudios con los medicamentos y modalidades que se definen en los títulos III y IV de esta resolución, ensayos con nuevos dispositivos, estudios que incluyen procedimientos quirúrgicos, extracción de sangre mayor al 2% del volumen circulante en neonatos, amniocentesis y otras técnicas invasoras o procedimientos mayores, los que empleen métodos aleatorios de asignación a esquemas terapéuticos y los que tengan control con placebos, entre otros; y en cumplimiento con los aspectos mencionados con el Artículo 6 de la presente Resolución, este estudio se desarrollará conforme a los siguientes criterios:

- a. El presente estudio se ajustará a los principios científicos y éticos que la justifiquen.
- b. Al tratarse de investigación en tejidos humanos se dispondrá de los mismos con el debido respeto, sin exponer nunca la confidencialidad de los sujetos de origen.
- c. El conocimiento que se pretende producir no puede obtenerse por otro medio idóneo y beneficiara a la población afectada en el entendimiento de los procesos fisiopatológicos y potencial investigación ulterior en tratamientos no quirúrgicos.
- d. La presente investigación se clasifica como “investigación sin riesgo”, puesto que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas,

cuestionarios y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensibles de su conducta.

e. Los participantes del estudio no tienen riesgo de lesiones físicas o mentales; el riesgo potencial es que se pierda la confidencialidad de sus datos personales. Sin embargo se velará vehemente por mantener su información en forma confidencial. Se espera que los resultados del presente estudio sirvan como punto de partida para la creación de recomendaciones y la invitación a crear políticas que permitan el libre desarrollo del ejercicio médico bajo la tutela de la evidencia científica, situación que beneficia de forma directa a toda nuestra población gremial.

19

f. El presente estudio se realizó por profesionales idóneos con conocimiento fundamentado en la academia y bajo el respaldo que nos acredita como miembros de la Universidad Nacional de Colombia para cuidar la integridad de los pacientes bajo la responsabilidad de una entidad de salud, supervisada por las autoridades de salud, siempre y cuando cuenten con los recursos humanos y materiales necesarios que garanticen el bienestar del sujeto de investigación.

g. Conforme a lo dispuesto en la ley 1581 de 2012, la información personal consignada en el instrumento de la investigación fue manejada velando por los principios de finalidad, libertad, veracidad, calidad, transparencia, acceso y circulación restringida, por lo tanto, no podrá ser utilizada para fines diferentes a la investigación, y su tratamiento será restringido al equipo investigador autorizado por el participante previamente. La información en ningún momento será utilizada con fines comerciales o económicos

h. El presente estudio, se llevó a cabo previa autorización: del representante legal de la institución investigadora y de la institución donde se realice la investigación; el Consentimiento Informado de los participantes; y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética en Investigación de la institución.

i. El estudio actual no representa ninguna remuneración económica para los participantes ni el grupo investigador, tampoco se incurrirán en gastos por parte de las entidades hospitalarias ni sus pacientes.

j. Se declara que no existen conflictos de intereses por parte del investigador y el desarrollo del presente estudio, ninguno de los integrantes encargados del análisis de la información está relacionado con empresas afines al sistema de salud (Farmacéuticas, aseguradoras, empresas promotoras de salud públicas o privadas)

Referencias Bibliográficas

1. Jick, S. L. *et al.* Lens and Cataract. in *Basic and Clinical Science Course* (American Academy of Ophthalmology, 2020).
2. López-Jaramillo, P., Camacho López, P. A., Gómez-Arbeláez, D., José, J. & Serrano, R. *La ceguera y la discapacidad visual son una prioridad de la salud pública en Colombia*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/>.
3. Zhao, L. *et al.* Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature* **523**, 607–611 (2015).
4. Pyrah, I. T. *et al.* Toxicologic lesions associated with two related inhibitors of oxidosqualene cyclase in the dog and mouse. *Toxicol. Pathol.* **29**, 174–179 (2001).
5. Shen, X. *et al.* Lanosterol Synthase Pathway Alleviates Lens Opacity in Age-Related Cortical Cataract. *J. Ophthalmol.* **2018**, (2018).
6. Determination and localization of Lanosterol Synthase in human cataractous lenses and their relationship with α A crystallin proteins. | IOVS | ARVO Journals. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2746343>.
7. Cenedella, R. J. *et al.* Direct perturbation of lens membrane structure may contribute to cataracts caused by U18666A, an oxidosqualene cyclase inhibitor. *J. Lipid Res.* **45**, 1232–1241 (2004).
8. Andley, U. P. The lens epithelium: Focus on the expression and function of the α -crystallin chaperones. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 40 317–323 (2008).
9. Benson, H. E. Lanosterol biosynthesis pathway (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guid. to Pharmacol. CITE* **2019**, (2019).
10. Huff, M. W. & Telford, D. E. Lord of the rings - The mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 26 335–340 (2005).
11. Casey, P. J. & Seabra, M. C. Protein prenyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* vol. 271 5289–5292 (1996).