



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

“ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA CATARATA INFANTIL”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OFTALMOLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA:

DRA. AGUSTINA MARTÍNEZ LAJARA

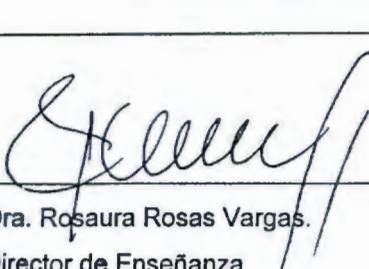
**TUTOR:
IRIS VIZZUETT LÓPEZ**



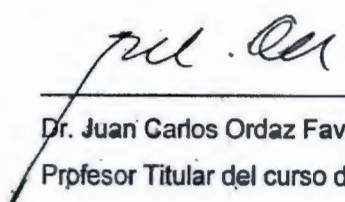
MÉXICO, D.F.

2015

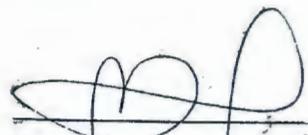
ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA CATARATA INFANTIL


Dra. Rosaura Rosas Vargas.
Director de Enseñanza


Dr. Manuel Enrique Flores Landero
Jefe del Departamento de Pre y Posgrado


Dr. Juan Carlos Ordaz Favila
Profesor Titular del curso de Oftalmología Pediátrica.


Dra. Iris Violeta Vizuetti López
Asesor de Contenido


Dra. Vanessa Bosch Canto
Asesor Metodológico



RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La catarata infantil representa una de las principales causas de ceguera en la población pediátrica (27% en países subdesarrollados). La ceguera contribuye además de manera importante a la mortandad pediátrica; se ha estimado que en los países de bajos recursos económicos hasta un 60% de los niños no sobreviven más allá de dos años después de la pérdida de la visión. Existen gran cantidad de estudios sobre las cataratas relacionadas con el envejecimiento, sin embargo pocos estudios se han enfocado en el estudio de esta patología en la población pediátrica. Las proteínas del cristalino de los niños < 2 años prácticamente no presentan modificaciones relacionadas con el envejecimiento por lo que las modificaciones encontradas en las cataratas a estas edades deben de estar relacionadas con el proceso de cataratogénesis. El modelo de la catarata infantil representa además una oportunidad única para identificar las modificaciones post-traduccionales asociadas con la formación de la catarata.

JUSTIFICACIÓN: La catarata infantil representa un importante problema de salud pública especialmente relevante en países como México. El presente protocolo brindará bases importantes para entender la fisiopatología de esta enfermedad a nivel molecular.

OBJETIVO: Describir por medio de estudios proteómicos las modificaciones post-traduccionales encontradas en las proteínas extraídas de cataratas de pacientes pediátricos menores de dos años de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio prospectivo de casos y controles donde se compararon los perfiles proteicos de las cataratas operadas en niños <2 años con los perfiles de cristalinos normales obtenidos de ojos enucleados por retinoblastoma (sin infiltración a cristalino, sin quimioterapia o radioterapia previa y sin signos de ptosis bulbi). Para la comparación se aislaron y separaron las proteínas mediante electroforesis bidimensional. La identificación de las proteínas que forman la catarata y las

modificaciones post-traduccionales que presentaron las cataratas todavía se encuentra en fase de estudio.

RESULTADOS: Se estudiaron mediante electroforesis bidimensional los cristalinicos de 10 pacientes con catarata congénita y se compararon con las muestras de cristalinicos normales. Se realizó la proteómica comparativa de estas, encontrando diferencias importantes en los perfiles proteicos de ambas muestras.

INTRODUCCIÓN

La catarata infantil representa una de las principales causas de ceguera en la población pediátrica; en los países subdesarrollados esta patología puede ser la causa de hasta el 27% de los casos de pérdida visual en la infancia. La ceguera contribuye además de manera importante a la mortalidad pediátrica; se ha estimado que en los países de bajos recursos económicos hasta un 60% de los niños no sobreviven más allá de dos años después de la pérdida de la visión. Aunque existe un vasto cuerpo de trabajo en el estudio de las cataratas relacionadas con el envejecimiento, pocos estudios se han enfocado en el estudio de esta patología en la población pediátrica. El modelo de la catarata infantil representa además una oportunidad única para identificar las modificaciones post-traduccionales asociadas con la formación de la catarata. A diferencia de los adultos mayores, las proteínas del cristalino de los niños menores de dos años prácticamente no presentan modificaciones relacionadas con el envejecimiento; es posible suponer entonces que las modificaciones encontradas en la catarata infantil deben de estar relacionadas con el proceso de cataratogénesis.

ANTECEDENTES

Generalidades

De manera general, la catarata puede ser definida como cualquier opacidad del cristalino; estas opacidades varían en morfología, localización, progresión y severidad.

El origen de estas opacidades puede relacionarse con el proceso natural de envejecimiento en el humano, pero puede estar asociado también a procesos patológicos secundarios derivados de factores ambientales, nutricionales, genéticos, infecciosos, traumáticos, etc. Las características utilizadas para clasificar clínicamente la catarata incluyen la edad de aparición de la misma, la localización, el tamaño, la densidad, la progresión y la severidad (1-3). La clasificación clínica puede ayudar a orientar el diagnóstico sobre la etiología de la catarata; en algunos casos por ejemplo, las cataratas representan características fenotípicas de desórdenes hereditarios (1).

Para clasificar las cataratas de acuerdo a su localización se han propuesto varios sistemas (4-8), pero en general se diferencia si la catarata involucra el núcleo, la capsula posterior, la corteza o alguna combinación de las anteriores. Clasificándolas por la edad de la aparición de esta patología, las cataratas pueden dividirse en: congénitas, si aparecen al nacimiento; infantiles, si aparecen dentro de la primera década de la vida; pre-seniles, si se presentan antes de los 45 años; y seniles si se encuentran después de esta edad. En cuanto a su progresión, algunas cataratas son estáticas, pero otras se modifican de manera progresiva. La severidad de la enfermedad varía además con la localización y la densidad de la catarata; en términos generales, mientras más posterior sea la localización y más densa sea la catarata, mayor será el impacto sobre la función visual (1-3).

El diagnóstico de la catarata es principalmente clínico, los principales signos y síntomas son leucocoria, fotofobia, nistagmus y estrabismo; estos dos últimos relacionados con la disminución de la agudeza visual. Dentro del abordaje diagnóstico, particularmente en los casos de cataratas no relacionadas con el envejecimiento, se considera deseable investigar la posible etiología relacionada con la aparición de la catarata. El tratamiento de la catarata es eminentemente quirúrgico con la remoción del

cristalino e implante de un lente intraocular según la edad del paciente, aunque la cirugía es sólo el primer paso en la rehabilitación visual del paciente. Debido a que en esta etapa de la vida los cambios refractivos y las complicaciones de la cirugía de cataratas son frecuentes (principalmente glaucoma y opacificación del eje visual), el paciente requiere un seguimiento cercano y continuo (9-10).

Catarata Infantil

La incidencia estimada de cataratas pediátricas es de 1-6 por cada 10,000 nacidos vivos y se considera que esta patología es una de las principales causas de ceguera infantil a nivel mundial; el *International Center for Eye Health* de la *London School of Hygiene & Tropical Medicine* ha estimado que esta patología es responsable del 15% de los casos de pérdida visual en la infancia. Existe además una asociación importante entre los niveles de desarrollo socioeconómico de un país y la presencia de cataratas como causa de ceguera infantil. En los países altamente desarrollados, alrededor del 8% de los casos de ceguera infantil se deben a cataratas, pero en los países pobremente desarrollados puede ser la causa de hasta el 27% de todos los casos. Como factor asociado resulta importante resaltar la alta mortalidad asociada a la ceguera infantil; por ejemplo, en el Reino Unido se ha descrito que a partir de la pérdida de la visión un 10% de los niños no sobreviven más allá de un año. Este problema es de mayor magnitud en los países pobremente desarrollados, donde hasta un 60% de los niños invidentes fallecen dentro del primer o segundo año después de la pérdida de la visión (11).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Fisiopatología molecular de la catarata

El cristalino y la córnea trabajan en conjunto para transmitir y refractar la luz que incide en la retina. Mientras que la córnea tiene funciones adicionales de protección, la principal función del cristalino es transmitir y enfocar la luz; en los mamíferos además, el cristalino es el único tejido capaz de enfocar adecuadamente la luz sobre la retina por el proceso conocido como acomodación (12, 13). El cristalino transmite la luz con longitudes de onda que van desde los 390 a los 1200 nm, mucho más allá del límite de la percepción visual. La transparencia del cristalino es la resultante de la apropiada arquitectura de las células del cristalino y el ajustado empaquetamiento de las proteínas contenidas en su estructura (14,15). En este sentido es interesante resaltar que el cristalino (especialmente el núcleo) presenta la mayor concentración de proteínas en comparación con cualquier otro tejido, aproximadamente el 60% de su peso húmedo es contenido proteico.

De las proteínas totales del cristalino, el 80-90% está formado por proteínas estructurales denominadas cristalinas α , β , y γ , las cuales desempeñan un papel crítico para la transparencia y correcta difracción de la luz (16). Dentro de las principales particularidades de estas proteínas se encuentran su alta estabilidad, solubilidad, transparencia y propiedades refractivas; por ejemplo, se sabe que cuando estas proteínas son concentradas a niveles por arriba de 450 mg/ml, el nivel de dispersión de la luz de hecho decrece (17,18). El 10-20% de las proteínas restantes encontradas en el cristalino son denominadas cristalinas taxón-específicas ya que se encuentran únicamente en una especie, o particularmente en unas pocas especies (16). De manera interesante, la mayoría de estas cristalinas taxón-específicas son enzimas metabólicas o derivados inactivos claramente relacionados a enzimas. Interesantemente una gran cantidad de

estas *enzimas-cristalinas* son proteínas que unen piridin nucleótidos (NADH o NADPH) o están relacionadas con proteínas de estrés o con enzimas desintoxicantes. Se ha propuesto que estas proteínas fueron seleccionadas como cristalinas no sólo por sus propiedades ópticas, sino por su habilidad para proteger al cristalino de los daños relacionados con el estrés oxidativo o la prolongada exposición a la luz ultravioleta (17-20).

A nivel molecular la fisiopatología de la catarata puede entenderse como un problema de modificaciones estructurales de las proteínas del cristalino que provocan su agregación, entrecruzamiento e insolubilización; la disrupción del fino balance en la estructura molecular afecta la transparencia del cristalino y causa la dispersión anómala de la luz. La cuestión fundamental sobre los procesos moleculares que dirigen la formación de las cataratas es entender los factores que alteran la estructura proteica y causan la agregación de las proteínas del cristalino; en este sentido, las modificaciones post-traduccionales han recibido especial atención. A causa del prácticamente nulo recambio de las proteínas del cristalino, estas modificaciones se acumulan en el transcurso de la vida y se piensa desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de las opacidades relacionadas con la edad. Sin embargo, gran parte de estas modificaciones se han observado también en las proteínas solubles del cristalino como parte normal del envejecimiento. Por lo tanto, ha sido particularmente difícil entender la contribución específica de las modificaciones en el proceso de cataratogénesis, y cómo éste difiere del proceso normal de envejecimiento (21).

Las modificaciones postraduccionales descritas incluyen la formación de puentes disulfuro, desamidación, oxidación, fosforilación, glicosilación, racemización e hidrólisis de la cadena principal de las proteínas (22-35). Ciertas modificaciones parecen ser cataratas-específicas (esto es, ocurren en muy bajos niveles durante el

envejecimiento); entre éstas se encuentran un incremento en la degradación de la α -cristalina en la catarata diabética (36), la presencia de especies anormales de α B-cristalinas en la catarata nuclear (37), y la desamidación incrementada de la γ S-Cristalina (38). Sin embargo, dado que dichas modificaciones ocurren tanto durante el envejecimiento normal como durante el desarrollo de las cataratas, las contribuciones específicas de dichas modificaciones en el proceso de opacificación del cristalino no han podido determinarse con precisión.

Cabe resaltar que las modificaciones post-traduccionales asociadas con el envejecimiento normal comienzan a ser evidentes desde etapas muy tempranas de la vida. El estudio de cristalinos normales de diferentes edades mostró que los cambios son apreciables desde los tres años de edad, y alcanzan prácticamente un máximo a la edad de 17 años; a esta edad, el patrón de modificaciones es sumamente parecido al de los lentes de 50 a 60 años. En este sentido, el estudio de las cataratas infantiles de pacientes menores de dos años de edad representa una oportunidad única para estudiar las modificaciones post-traduccionales relacionadas con el desarrollo de las cataratas, desligados de las modificaciones propias del envejecimiento (39-41).

Por otro lado, se conocen mutaciones génicas condicionantes de catarata infantil, principalmente congénita, en genes que codifican para las proteínas del cristalino. Cuando las mutaciones en las cristalinas son suficientes por ellas mismas para causar agregación resultan usualmente en catarata congénita; por otro lado, si las mutaciones incrementan la susceptibilidad al daño ambiental pueden aumentar la propensión a presentar cataratas relacionadas con el envejecimiento (2).

La mayoría de las cataratas congénitas son heredadas con un patrón autosómico dominante, aunque las formas autosómicas recesivas o ligadas al X han sido también descritas. En los casos de catarata aislada los individuos afectados no presentan

manifestaciones sistémicas asociadas; sin embargo existen una serie de síndromes hereditarios donde el individuo afectado además de la catarata, presenta alteraciones asociadas en otros órganos. Así, la catarata aislada explica aproximadamente el 70% de las cataratas congénitas; en otro 15% de los casos las opacidades lenticulares se asocian con anomalías oculares como microftalmia, aniridia, degeneraciones retínales o anomalías en el desarrollo de la cámara anterior, mientras que el 15% de los casos restantes de catarata congénita pueden ser parte de desórdenes genéticos multisistémicos tales como anomalías cromosómicas o bien entidades monogénicas como galactosemia, el síndrome de Lowe (síndrome cerebro oculo-renal) o la neurofibromatosis tipo II (2).

Hasta el año 2008 se han descrito alrededor de 40 loci claramente relacionados con cataratas congénitas; de estos, 26 han sido asociados con mutaciones en genes específicos. De las cataratas en las que se conoce el gen afectado alrededor de la mitad presentan mutaciones en las cristalinas, otro 25% tiene mutaciones en las conexinas y el 25% restante se encuentra dividido entre los genes del factor de transcripción de choque térmico-4 (HSF4), la acuaporina-0 (AQP0), y la proteína estructural filamentosa-2 (BFSP2) (2).

Dado que la diferenciación ocular sigue un patrón temporal específico, en algunas ocasiones es posible observar cierta correlación entre las mutaciones causantes de las cataratas y la morfología de la misma. Por ejemplo, la catarata de tipo nuclear sugiere una anomalía en la expresión genética durante el desarrollo temprano del ojo (el núcleo representa la primera región en ser formada durante el desarrollo embriológico ocular); por el contrario, las cataratas de tipo cortical pueden indicar una anomalía tardía durante el desarrollo ocular. En este mismo sentido, la asociación entre las anomalías oculares extra-lenticulares y la presencia de catarata congénita

puede ayudar a orientar el posible defecto genético asociado. Las mutaciones de los factores de transcripción o crecimiento, por ejemplo, se asocian generalmente con anormalidades oculares generalizadas dado que estos factores son necesarios para el desarrollo completo del órgano. Por otro lado, las mutaciones en algunas cristalinas se asocian en ocasiones no sólo con la formación de cataratas sino también con microcórnea y microfaquia, probablemente debido a la dependencia en el desarrollo de la cámara anterior con el desarrollo normal del cristalino (2).

JUSTIFICACIÓN

La catarata infantil representa una de las principales causas de ceguera en la población pediátrica; en los países subdesarrollados esta patología puede ser la causa de hasta el 27% de los casos de pérdida visual en la infancia. La ceguera contribuye además de manera importante a la mortalidad pediátrica; se ha estimado que en los países de bajos recursos económicos hasta un 60% de los niños no sobreviven más allá de dos años después de la pérdida de la visión. Es evidente que la catarata infantil representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, pero que es especialmente relevante en países en vías de desarrollo como México.

El presente proyecto plantea el estudio molecular de la catarata infantil por medio de estudios proteómicos; aunque existe un vasto cuerpo de trabajo en el estudio de las cataratas relacionadas con el envejecimiento, pocos estudios se han enfocado en el estudio de esta patología en la población pediátrica. El modelo de la catarata infantil representa además una oportunidad única para identificar las modificaciones post-traduccionales asociadas con la formación de la catarata. A diferencia del cristalino de los adultos mayores, las proteínas del cristalino de los niños menores de dos años prácticamente no presentan modificaciones relacionadas con el envejecimiento; por tanto, es posible suponer que las modificaciones encontradas en la catarata infantil

deben de estar relacionadas con el proceso de cataratogénesis. Además, no existen estudios que hayan correlacionado las características clínicas de la catarata, el perfil proteómico y los genes mutados, por lo que en este estudio puede sentar las bases para ello.

El Instituto Nacional de Pediatría representa un centro de referencia a nivel nacional en el diagnóstico y tratamiento de la catarata en la población infantil. En la torre de investigación se cuenta, además, con la infraestructura material y humana necesaria para la realización de los estudios proteómicos que representan la base del presente proyecto. De esta forma, el presente protocolo representa un proyecto de investigación relevante, original, viable y multidisciplinario que brindará bases importantes para entender la fisiopatología de esta enfermedad a nivel molecular.

OBJETIVOS

General

- Describir las modificaciones post-traduccionales encontradas en las proteínas extraídas de cataratas de pacientes pediátricos menores de dos años de edad.

Específicos

- Clasificar a las cataratas de acuerdo a su localización y forma.
- Identificar las diferencias en los patrones proteicos de las cataratas y del cristalino normal en pacientes pediátricos menores de dos años de edad.
- Identificar las diferencias en los patrones proteicos de las cataratas y del cristalino dependiendo del diagnóstico etiológico condicionante de las cataratas (aislada vs sindromática).
- Identificar las modificaciones post-traduccionales presentes en las proteínas extraídas de cataratas de pacientes pediátricos menores de dos años de edad.

- Identificar las diferencias en las modificaciones post-traduccionales presentes en las proteínas extraídas de cataratas de acuerdo al diagnóstico etiológico condicionante de las cataratas (aislada vs. sindrómica).
- Determinar si existen diferencias entre los perfiles proteómicos y en las modificaciones post-traduccionales de acuerdo a la clasificación del tipo de catarata aislada.

HIPÓTESIS

Las proteínas que forman las cataratas en niños menores de dos años presentarán modificaciones post-traduccionales no presentes en las proteínas de cristalinos normales.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes con diagnóstico de catarata menores de 2 años que sean sometidos a tratamiento quirúrgico para su corrección en el INP durante el periodo del proyecto.

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión serán los que definen las indicaciones para la realización de la cirugía.

- Opacidades mayores de 3 mm
- Opacidades que se encuentren el eje visual
- Opacidades totales que estén o no asociadas a enfermedades sistémicas o trastornos psicomotores
- Opacidades totales aisladas o que formen parte de una entidad sindrómica cromosómica o monogénica.

Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión son los mismos que contraindican la realización de la cirugía y que se encuentran relacionados con la presencia de patologías que ocasionen falta de integridad de la vía visual, independiente de la presencia de la catarata, de manera tal que su remoción no conlleva beneficios para el paciente.

- Perfil TORCH positivo para algunas de las enfermedades del panel junto con alteración de potenciales visuales que indiquen alteración de la retina.
- Glaucoma asociado
- Patología de alguno de los medios transparentes (córnea o vítreo).
- Uveítis activa
- Rubeosis iridis

Población control

Las muestras controles de cristalinos normales se obtienen de pacientes sometidos a necropsia en el Departamento de Patología del INP y de ojos enucleados como tratamiento de retinoblastoma. No se incluyen aquellos pacientes que presenten trauma, malformaciones u opacidades oculares o tengan antecedentes de patologías oftálmicas. Las muestras obtenidas de pacientes con retinoblastoma deben cumplir tres requisitos fundamentales: a) el ojo enucleado no debe de haber recibido tratamiento previo (termoterapia, quimioterapia, radioterapia, etc.), b) no debe existir infiltración del retinoblastoma al cristalino, y, c) no deben apreciarse signos de degeneración ocular evidente (*ptisis bulbi*). Una vez disecado, el cristalino se almacena en ultracongelación en el amortiguador de solubilización hasta su utilización; este amortiguador contiene desnaturalizantes, un agente reductor y detergente, lo cual resulta suficiente para disgregar el tejido y extraer las proteínas que forman el cristalino normal.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La toma de la muestra de las cataratas se realizará previo consentimiento informado, dentro del procedimiento quirúrgico para la corrección del padecimiento. Es importante hacer notar que la toma de la muestra no representa ningún riesgo adicional para el paciente dado que la cirugía se basa precisamente en la extirpación de la catarata y el cristalino. Las muestras de cristalinos normales se obtendrán bajo consentimiento informado.

METODOLOGÍA

Estudio clínico de los pacientes

Con el fin de establecer si la catarata a analizar se considera aislada o es parte de una entidad sindrómica, los pacientes serán evaluados en la consulta externa de Genética por un médico genetista, quien realizará la historia clínica con el árbol genealógico así como una exploración física detallada, de acuerdo a ello determinará si el paciente presenta una entidad sindrómica, si es necesario se solicitarán los estudios de laboratorio y gabinete pertinentes que se consideran parte del abordaje diagnóstico del paciente (ejemplo. cariotipo o tamiz metabólico).

Por parte del servicio de Oftalmología se clasificará la catarata morfológicamente acorde a Subcapsular (cupuliforme), Nuclear-lamelar, Nuclear, Capsular (polar), Sutural, Supranuclear (coronaria), Cortical (cuneiforme) (42); como se mencionó, la morfología de la catarata permite orientar en algunos casos el posible defecto genético relacionado con la formación de la catarata; además, la clasificación de esta manera tendrá como objetivo definir si de acuerdo a los perfiles proteómicos identificados existen diferencias de acuerdo al tipo de catarata. En caso de observar diferencias en perfiles proteómicos de acuerdo al tipo de catarata se considerará en un futuro llevar al

cabo estudios moleculares en posibles genes responsables para la búsqueda de mutaciones en ellos.

Obtención de las muestras

Se realiza procedimiento bajo anestesia general, asepsia, antisepsia, colocación de campos estériles y campo adhesivo (upsite) para cirugía ocular. Se coloca el blefarostato para exponer el área quirúrgica y se irriga la córnea con solución salina balanceada (SSB). Usando el microscopio, se procede a realizar una incisión corneal (puerto lateral M III) con cuchillete de 15°, se introduce viscoelástico (condroitín sulfato con hialuronato de sodio) a cámara anterior. Posteriormente, se realiza incisión corneal (M XI) con cuchillete de 3.2mm. Para mejor visualización, se tiñe la cápsula anterior con azul tripano y se realiza una capsulotomía circular continua con pinzas de Utrata y/o cistitomo a través de la incisión principal. Se realiza la hidrodisección entre cápsula y corteza hasta permitir el movimiento libre del núcleo dentro de la cápsula y corteza; el núcleo se aspira para toma de muestra para estudio proteómico, con cánula fina, posteriormente continua con el procedimiento habitual aspirando con la punta de la pieza de mano, requiriendo o no pulsos de ultrasonido, trabajando principalmente en la cámara posterior. La pieza de mano de irrigación/aspiración sustituye a la anterior y con ella se aspira el remanente de corteza adherido aún a la bolsa capsular. Se aplica viscoelástico (hialuronato de sodio y condroitín sulfato) para reformar la bolsa capsular y la cámara anterior para realizar capsulotomía posterior y vitrectomía anterior, vía pars plana, o vía anterior, con vitrector del equipo de facoemulsificación, asegurándose de remover todo el vítreo localizado en cámara anterior y liberando las bandas vítreas de la herida esclerocorneal y del borde pupilar, se implanta un lente intraocular para incisión pequeña plegable o inyectable, cuya etiqueta queda adherida al reporte postoperatorio en el expediente clínico. El lente intraocular se

selecciona en base al cálculo realizado con la medición obtenida por ultrasonido modo A, realizados con anterioridad. Tras colocar el lente intraocular dentro de la bolsa en la posición seleccionada de acuerdo al desarrollo de la cirugía, el viscoelástico se remueve de la cámara anterior con la pieza de irrigación/aspiración y se sustituye con solución para irrigación ocular. Se coloca una sutura con nylon 10-0 para cerrar herméticamente la incisión principal. Ambas se sellan con solución para irrigación ocular hidratando el estroma corneal en sus comisuras. El blefarostato se retira, se aplica antibiótico y antiinflamatorio local y se coloca un parche ocular. Las muestras de cristalinos normales a partir de necropsias se toman por aspiración con aguja fina.

Para la colecta y transporte de las muestras se siguió el siguiente protocolo: la M. en C. Adriana Castillo, adscrita al Laboratorio de Bioquímica-Genética, fue la responsable del manejo de las muestras desde el lugar de la toma (Departamento de Patología o Quirófanos centrales) hasta el lugar de su procesamiento (Laboratorio de Bioquímica-Genética). Los responsables de la toma de la muestra (Dra. Martínez-Lajara, Dra Vizzuett, Dr. Juárez, Dra. Varón, Dra Fernández, Dra Bosch) avisan al laboratorio de Bioquímica-Genética (Dr. Oria, Dr. Reyes, M. en C. Castillo) de la disponibilidad de una muestra; la maestra Castillo recoge y transporta la muestra manteniéndola aproximadamente a 4°C durante el trayecto (Patología/Quirófanos, patio central, estacionamiento de residentes, torre de investigación, 6to piso) que no toma más de 15 minutos. La Maestra Castillo entrega la muestra (Dr. Reyes o Dr. Oria) para el inicio de su procesamiento como se detalla a continuación.

Análisis de proteínas totales por electroforesis en segunda dimensión (proteómica).

Para analizar las proteínas totales de las cataratas o de cristalinos normales se utiliza el análisis de electroforesis en dos dimensiones. Después de que tanto las muestras de cataratas como de cristalinos normales se disuelven en un amortiguador conteniendo 25

mM de MOPS, pH 7.4, e inhibidores de proteasas, se homogeneizan por sonicación. El extracto crudo se precipita con acetona fría para eliminar los componentes no proteicos y, posteriormente, el extracto se centrifuga a 16,000 rpm/4°C durante 30 min. El botón se resuspende en un amortiguador conteniendo 8 M de urea, 2 % de CHAPS, y 50 mM de DTT. La solución de proteínas se centrifuga nuevamente y, posteriormente, se filtra con 0.45 μ m de corte de paso. Una vez filtrada, se determina la concentración de proteína y se añade a la solución 0.2 % (p/v) de anfolinas con intervalo de pH de 3 a 10. Esta muestra se utiliza para realizar la electroforesis en dos dimensiones. Para la primera dimensión, que consiste en separar a las proteínas por su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque), se utilizan tiras de gel conteniendo un intervalo de pH de 3 a 10. Se aplican 150 μ g de la proteína a las tiras y se corren en un equipo de isoelectroenfoque. Se aplica un programa de voltaje escalonado hasta obtener una relación final de 14,000 Volts/horas. Al término de la separación, la tira se incuba 10 min en un amortiguador conteniendo 25 mM de Tris, 192 mM glicina, 50 mM DTT y 0.1 % de SDS, pH 8.3. Posteriormente, la tira se incuba 10 min en oscuridad en un amortiguador que contiene 25 mM de Tris, 192 mM glicina, 150 mM Iodoacetamida y 0.1 % de SDS, pH 8.3. Para realizar la segunda dimensión, que consiste en separar a las proteínas por su peso molecular, la tira se carga en un gel desnaturalizante prefabricado de Tris-glicina con un porcentaje de acrilamida del 12 %. La tira se corre electroforéticamente en paralelo con un marcador de peso molecular. La electroforesis se lleva a cabo a 4°C a 120 Volts constante hasta que la marca de azul de bromofenol salga del gel. Al término de la separación, el gel se tiñe con azul de Coomassie R-250, o bien, con SYPRO o con plata compatible con espectrometría de masas. Al término de la tinción, el gel se fotodocumenta y analiza como se detalla a continuación.

Análisis de los datos

El análisis de los datos se realiza con los programas Quantity One, PDQuest, MassLynx, ProteinLynx y Mascot. Brevemente, después de digitalizados los geles, las imágenes son comparadas (muestra control vs. caso) con el programa PDQuest. Para cada gel, el programa asigna a cada *spot* un par de coordenadas (x,y) y una densidad basada en el número de píxeles que forman el *spot*. El software compara entonces la posición y la densidad de todos los spots entre ambas condiciones y busca las diferencias entre estos. Las diferencias pueden ser de posición, esto es, *spots* que sólo están presentes en alguna de las dos condiciones; o de expresión, un mismo *spot* presente en la misma posición en ambas muestras pero que en una de las condiciones presenta una densidad aumentada o disminuida. Los spots que presentan diferencias entre ambas condiciones son, en principio, las proteínas relacionadas con el proceso de formación de las cataratas por lo que se procede a su identificación por espectrometría de masas.

Las proteínas cuyo cambio de expresión se detecta por la técnica de dos dimensiones, se identifican utilizando el método de *fingerprint* con espectrometría de masas por desorción asistida por láser acoplado a tiempo de vuelo (MALDI-ToF-MS). Para realizar el *fingerprint* los "spots" de proteína se cortan finamente con una punta de micropipeta y se colocan separadamente en tubos eppendorf. Los fragmentos de gel se destiñen con una solución de acetonitrilo al 50 % en 2.5 mM de bicarbonato de amonio; los fragmentos se incuban dos veces en esta solución por dos horas a 25°C. Posteriormente, los geles se deshidratan completamente con un sistema de vacío. Al término de la desecación, los geles se incuban con 10 mM de DTT durante 30 min a 25°C para reducir todas las proteínas. Al término de la incubación, el DTT se remueve e inmediatamente los geles se incuban con 100 mM de iodoacetamida durante 30 minutos

con la finalidad de alquilar a las proteínas en sus residuos de cisteínas. Al término de la incubación, la iodoacetamida que no reaccionó se remueve.

Después de este proceso, los fragmentos de gel se incuban en una solución de bicarbonato de amonio conteniendo la proteasa tripsina; los geles se incuban 12 hrs a 37°C. Este proceso permite tripsinizar completamente a las proteínas contenidas en el interior del gel. Al término de la digestión, los péptidos se extraen del gel y, posteriormente, se concentran mediante evaporación.

Para la identificación de las proteínas, los péptidos obtenidos se mezclan con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico disuelto en 50 % de acetonitrilo/0.1 % de ácido trifluoroacético. Esta mezcla permite obtener una solución cristalina que favorece la desadsorción de los péptidos por el equipo de masas. Las muestras se colocan en el MALDI-ToF-MS y se genera una lista de las masas de los péptidos; esta lista se utiliza para identificar a la proteína y las modificaciones postraduccionales existentes en las bases de datos del NCBI y, específicamente, en aquellas del genoma humano, mediante el uso del programa ProteinLynx, las bases de datos utilizan un formato tipo FASTA, mismo que se obtiene utilizando el servidor de UNIPROT. Alternativamente, se utiliza el programa MASCOT (Matrix Science, LTD., London, United Kingdom; <http://www.matrixscience.com>); lo anterior con la finalidad de corroborar los datos obtenidos con ProteinLynx.

Para la identificación de proteínas por el método de fingerprint utilizando MALDI-ToF/MS, se utiliza el algoritmo de Mowse (43). Dicho algoritmo compara el valor calculado del peso molecular (PM) de cada péptido contra el de una base de datos de secuencias de proteínas. El algoritmo asigna un valor para cada péptido evaluado y para cada secuencia de proteína evaluada. Este valor, designado como valor "M", representa la probabilidad de que una proteína se identifique exitosamente, respecto a la

probabilidad de ser asignada simplemente por azar. El valor "M" es inversamente proporcional a una asignación exitosa de identificación; es decir, a mayor valor "M", menor probabilidad de éxito. Por tanto, al valor "M" se le aplica la operación $[-10X\text{Log}10(P)]$, donde "P" es el valor de "M" con mayor probabilidad de éxito. Así, un valor "P" de 10^{-20} se reporta como 200. De esta forma, el valor de la operación de "P" es directamente proporcional a la probabilidad de que una proteína sea identificada exitosamente.

RESULTADOS

El grupo control estuvo constituido por 9 cristalinos obtenidos todos ellos a partir de enucleaciones en pacientes con retinoblastoma que cumplían los tres requisitos fundamentales: a) el ojo enucleado no debe de haber recibido tratamiento previo (termoterapia, quimioterapia, radioterapia, etc.), b) no debe de existir infiltración del retinoblastoma al cristalino, y, c) no deben de apreciarse signos de degeneración ocular evidente (*ptisis bulbi*).

En el grupo de casos se incluyeron 10 pacientes (7 hombres y 3 mujeres) de edades comprendidas entre 3 meses y 2 años (media 10.7 meses). En relación a las características clínicas de la serie, 9 cataratas fueron bilaterales y sólo una unilateral. Dos pacientes presentaron microftalmos asociado a la catarata, uno presentaba lenticono posterior y en los 7 restantes la catarata fue la única patología ocular encontrada. A la exploración en el momento del diagnóstico 3 pacientes presentaban estrabismo en forma de endodesviación en todos ellos y en 3 pacientes se encontró nistagmo sensorial secundario a las cataratas. Respecto a los tipos de catarata, 4 fueron nucleares, 2 lamelares, una pulverulenta, una membranosa, una subcapsular posterior y un lenticono posterior. En el momento de la cirugía se realizó implante de lente intraocular (LIO) en 6 pacientes mientras que 4 quedaron en afaquia. Tras la evaluación

por el Servicio de Genética ,4 cataratas fueron consideradas cataratas aisladas pues los pacientes presentaron crecimiento y desarrollo psicomotor normales y a la exploración física no se encontraron anomalías ni dismorfias. Las 6 cataratas restantes se consideraron sindrómicas pues presentaron alteraciones tales como, patrón aumentado del crecimiento (1/6), retraso global del neurodesarrollo (5/6), epilepsia/leucoencefalopatía (1/6) y múltiples dismorfias pero sin integrar en un síndrome en específico (1/6).

Cuadro 1. Características epidemiológicas y clínicas de la serie de casos

	Sexo	Edad diagnóstica	Edad cirugía		Características cataratas	Valoración genética	Clinica asociada	LIJ
			OD	OI				
Caso 1 (Fig. 1)	M	4m	6m	10m	- Bilateral - Lamelar - Microftalmos	SINDRÓMICA	- Nistagmo - ET 50DP	NO
Caso 2 (Fig. 2)	F	4m	5m	5m	- Bilateral - Nuclear completa	SINDRÓMICA		NO
Caso 3 (Fig. 3)	M	4m	6m	10m	- Bilateral - Pulvurulenta	AISLADA		SI
Caso 4 (Fig. 4)	F	12m		1a	- Unilateral - Polar posterior	SINDRÓMICA		SI
Caso 5 (Fig. 5)	M	23m	24m	24m	- Bilateral - Membranosa - Microftalmos	SINDRÓMICA		SI
Caso 6	M	24m	24m	24m	- Bilateral - Nuclear	AISLADA	- Nistagmo - ET 30DP	SI
Caso 7	M	3m	3m	3m	- Bilateral - Membranosa	AISLADA		NO
Caso 8 (Fig. 6)	M	18m	18m	19m	- Bilateral - Subcapsular posterior	SINDRÓMICA	- ET 45DP	SI
Caso 9	M	4m	4m	4m	- Bilateral - Lenticono	SINDRÓMICA	- Nistagmo	NO
Caso 10	F	11m	12m	12m	- Bilateral - Nuclear	AISLADA		SI



Figura 1. Catarata lamelar con jinetes



Figura 2. Catarata nuclear



Figura 3. Catarata pulverulenta



Figura 4. Catarata polar posterior

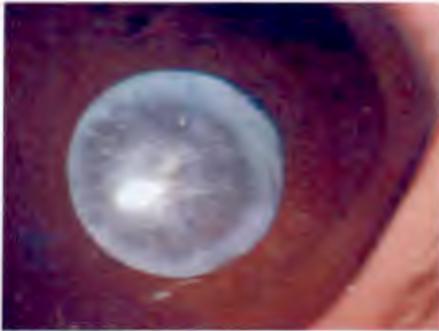


Figura 5. Catarata membranosa



Figura 6. Subcapsular posterior

Una vez obtenidas las muestras de casos y controles se procedió a la separación y aislamiento de las proteínas por medio de electroforesis bidimensional. Se utilizó un método de cuantificación colorimétrico para determinar la concentración de proteína de cada una de las muestras. La reproducibilidad del método se determinó en experimentos duplicados a tres volúmenes diferentes de solución de proteína problema con un error asociado menor al 10%.

Para la tinción de las muestras proteicas obtenidas de cataratas o cristalinos normales se utilizó la técnica de Coomassie coloidal.

Por último, dado que la comparación de los patrones proteómicos requiere un análisis estadístico del número total *de spots* que forman la muestra, es necesario realizar por lo menos experimentos triplicados de cada muestra, de tal manera que las imágenes individuales de estos experimentos puedan promediarse digitalmente y compararse con el promedio de las muestras control. Como puede observarse en la Figura 7, los experimentos triplicados muestran una excelente correlación entre si tanto en las muestras control como en las muestras de catarata. Se compararon las imágenes de los geles maestros del cristalino sano y de la catarata. En la imagen de cristalino sano se lograron detectar 84 spots, mientras que en la imagen de cataratas se detectaron 123. Únicamente 27 spots coincidieron entre los geles del cristalino y las cataratas, mientras que 96 spots fueron diferentes.

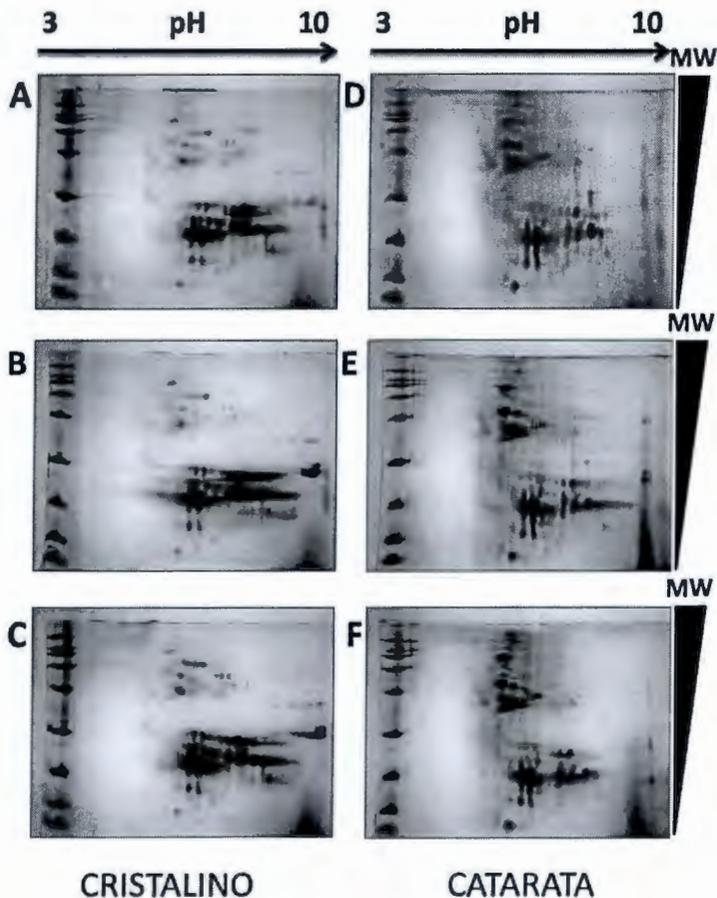


Figura 7. Comparación de los geles maestros del cristalino sano y de la catarata. (Experimento por triplicado para mostrar la reproducibilidad de la metodología). La flecha superior indica el intervalo de pH utilizado para la separación en primera dimensión mientras que el triángulo de la derecha indica la separación en la segunda dimensión por peso molecular (MW).

Para el caso de la muestra del cristalino sano, los spots se localizaron en una de las cuatro regiones claramente definidas en el gel (Figura 8). En contraste, en el caso de

la muestra de cataratas, los spots se distribuyeron en el gel de forma más desorganizada, perdiéndose las cuatro regiones que se observan en el cristalino. La diferencia entre muestras de cristalino y catarata podría explicarse en dos formas.

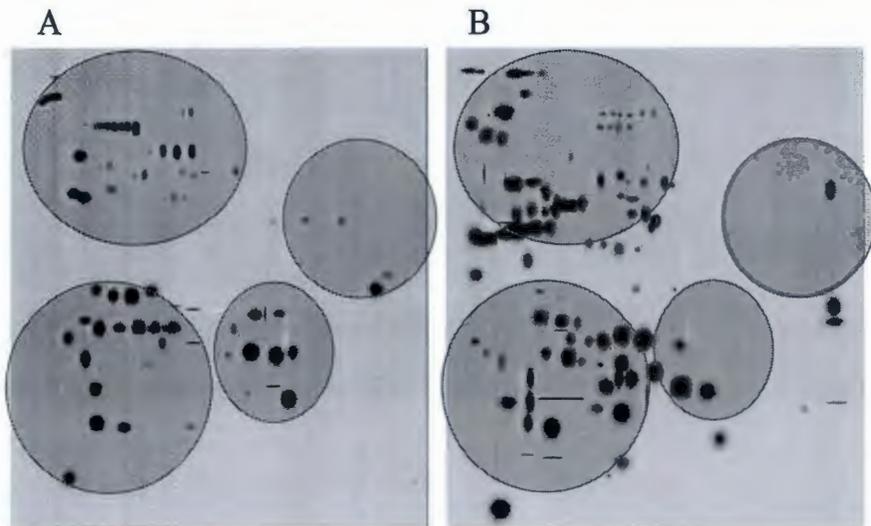


Figura 8. Comparación de la localización de los spots. Los círculos muestran las cuatro regiones donde se encuentran contenidos la mayoría de los spots en el cristalino. Estas mismas regiones se comparan en la muestra de catarata.

La primera es que la generación de cataratas podría incrementar el número de isoformas de las proteínas presentes en el cristalino. Tales isoformas se generarían por modificaciones post-transcripcionales producidas previo o durante la formación de la catarata; por ejemplo, oxidaciones y desamidaciones. Lo anterior es consistente con la observación de que la mayoría de los nuevos spots se desplazaron hacia valores de pH más ácidos. A pesar de que este comportamiento es similar a lo observado en las

muestras de cataratas generadas por envejecimiento (40), es necesario realizar el estudio de MALDI-ToF/MS para identificar que proteínas se modificaron y conocer el tipo de modificación post-transcripcional presente en las muestras de catarata congénita. La segunda es que la muestra de catarata exhibe nuevos spots con pesos moleculares distintos a los presentes en el cristalino. Esto puede significar la formación de agregados irreversibles entre distintas proteínas, así como de la presencia de proteínas truncadas.

Identificación de las proteínas representadas diferencialmente entre las muestras proteicas de cataratas y de cristalinos normales.

Una vez identificadas las diferencias en los perfiles proteómicos, es necesaria la identificación de las proteínas que forman las cataratas así como de las modificaciones postraduccionales que puedan ocurrir en estas proteínas; este proceso se realiza por espectrometría de masas en formato MALDI-ToF. En este momento nos encontramos realizando esta parte del proyecto, el cual consiste en proteolizar las proteínas contenidas en los spots de interés, extraer los péptidos derivados de la proteólisis, preparar las muestras para el espectrómetro de masas e identificar las proteínas y las modificaciones presentes por la técnica de *fingerprint*.

CONCLUSIONES

El estudio de la catarata infantil representa una oportunidad para entender los mecanismos que conducen a la formación de las cataratas independientemente de los cambios propios del envejecimiento, los cuales han hecho especialmente difícil de entender el proceso de cataratogénesis en el ser humano. La identificación de las proteínas que forman las cataratas y sus modificaciones pueden contribuir a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de la cataratogénesis a nivel molecular.

Este estudio representa la primera fase de una línea de investigación que pretende entender la fisiopatogenia de la catarata infantil, así como la asociación de determinados patrones de cataratas con patologías específicas (síndrome de Down, infecciones intrauterinas, desordenes metabólicos, etc) e incluso asociaciones entre perfiles proteómicos y modificaciones post-traduccionales con las características clínicas de la catarata (localización, tamaño, densidad y severidad de la catarata, por ejemplo). Ello permitiría la identificación de marcadores biológicos de la enfermedad que ayuden posteriormente a elaborar diagnósticos etiológicos certeros y métodos de clasificación más precisos basados en población mexicana.

Respecto a las características de los pacientes de nuestra serie, difieren a lo descrito en la literatura en relación a la frecuencia de asociación entre catarata y deósdenes multisistémicos. Según la literatura la catarata aislada explica aproximadamente el 70% de las cataratas congénitas; en otro 15% de los casos las opacidades lenticulares se asocian con anormalidades oculares como microftalmia, aniridia, degeneraciones retíales o anormalidades en el desarrollo de la cámara anterior, mientras que el 15% de los casos restantes de catarata congénita pueden ser parte de desórdenes genéticos multisistémicos. En nuestra casuística 6 de los 10 pacientes (60%) se consideraron cataratas sindrómicas (aún por especificar según resultados de cariotipo). Esto podría explicarse porque al tratarse de un centro de referencia termina siendo un centro de concentración de casos sindrómicos.

REFERENCIAS

- 1.- Hejtmancik, J.F; Kaiser, M.I; and Piatigorsky, J. (2001) Molecular Biology and inherited disorders of the eye lens. In Scriver C.R. *et al* (Eds.). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York. McGraw Hill.
- 2.- Hejtmancik JF. Congenital cataracts and their molecular genetics. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Apr;19(2):134-49.
- 3.- Francis PJ, Moore AT. Genetics of childhood cataract. *Curr Opin Ophthalmol*. 2004 Feb;15(1):10-5.
- 4.- Chylack LT Jr, Leske MC, McCarthy D, Khu P, Kashiwagi T, Sperduto R. Lens opacities classification system II (LOCS II). *Arch Ophthalmol*. 1989 Jul;107(7):991-7.
- 5.- Klein BE, Klein R, Linton KL, Magli YL, Neider MW. Assessment of cataracts from photographs in the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1990 Nov;97(11):1428-33.
- 6.- Taylor HR, West SK. The clinical grading of lens opacities. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1989 Feb;17(1):81-6.
- 7.- Sparrow JM, Bron AJ, Brown NA, Ayliffe W, Hill AR. The Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System. *Int Ophthalmol*. 1986 Dec;9(4):207-25.
- 8.- Merin S. (1974) Congenital cataracts. In Golberg MF (Ed.). *Genetic and metabolic eye disease*. Boston, Little, Brown.
- 9.- Trivedi RH, Wilson ME. (2009) Pediatric Cataract: Preoperative Issues and Considerations. In Wilson ME *et al* (Eds.). *Pediatric ophthalmology*. Berlin, Springer.
- 10.- Wilson ME, Trivedi RH. (2009) Pediatric Cataract Surgery: Operative and Postoperative Issues. In Wilson ME *et al* (Eds.). *Pediatric ophthalmology*. Berlin, Springer.

- 11.- Gilbert C. (2009) Worldwide Causes of Blindness in Children. In Wilson ME et al (Eds.). *Pediatric ophthalmology*. Berlin, Springer.
- 12.- Bettelheim FA. (1985) Physical basis of lens transparency. In: Maisel, H. (Ed.). *The Ocular Lens*. New York, Marciel Dekker Inc.
- 13.- Delaye M, Gromiec A. Mutual diffusion of crystallin proteins at finite concentrations: a light scattering study. *Biopolymers*. 1983 Apr;22(4):1203-21.
- 14.- Benedek GB. Theory of transparency of the eye. *Appl Opt*. 1971 Mar 1;10(3):459-73.
- 15.- Delaye M, Tardieu A. Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature*. 1983 Mar 31-Apr 6;302(5907):415-7.
- 16.- Wistow GJ, Piatigorsky J. Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:479-504.
- 17.- de Jong WW, Hendriks W, Mulders JW, Bloemendal H. Evolution of eye lens crystallins: the stress connection. *Trends Biochem Sci*. 1989 Sep;14(9):365-8.
- 18.- Wistow G. Evolution of a protein superfamily: relationships between vertebrate lens crystallins and microorganism dormancy proteins. *J Mol Evol*. 1990 Feb;30(2):140-5.
- 19.- Piatigorsky J, Wistow G. The recruitment of crystallins: new functions precede gene duplication. *Science*. 1991 May 24;252(5009):1078-1079.
- 20.- Zigler JS Jr, Rao PV. Enzyme/crystallins and extremely high pyridine nucleotide levels in the eye lens. *FASEB J*. 1991 Feb;5(2):223-5.
- 21.- Harrington V, Srivastava OP, Kirk M. Proteomic analysis of water insoluble proteins from normal and cataractous human lenses. *Mol Vis*. 2007 Sep 14;13:1680-94.
- 22.- Lund AL, Smith JB, Smith DL. Modifications of the water-insoluble human lens alpha-crystallins. *Exp Eye Res*. 1996 Dec;63(6):661-72.

- 23.- Hanson SR, Hasan A, Smith DL, Smith JB. The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage. *Exp Eye Res.* 2000 Aug;71(2):195-207.
- 24.- Spector A. The search for a solution to senile cataracts. Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984 Feb;25(2):130-46.
- 25.- Nagaraj RH, Sell DR, Prabhakaram M, Ortwerth BJ, Monnier VM. High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 15;88(22):10257-61.
- 26.- McDermott M, Chiesa R, Roberts JE, Dillon J. Photooxidation of specific residues in alpha-crystallin polypeptides. *Biochemistry.* 1991 Sep 3;30(35):8653-60.
- 27.- MacCoss MJ, McDonald WH, Saraf A, Sadygov R, Clark JM, Tasto JJ, Gould KL, Wolters D, Washburn M, Weiss A, Clark JI, Yates JR 3rd. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):7900-5.
- 28.- Wilmarth PA, Tanner S, Dasari S, Nagalla SR, Riviere MA, Bafna V, Pevzner PA, David LL. Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility? *J Proteome Res.* 2006 Oct;5(10):2554-66.
- 29.- Srivastava OP, Srivastava K. Existence of deamidated alphaB-crystallin fragments in normal and cataractous human lenses. *Mol Vis.* 2003 Apr 16;9:110-8.
- 30.- Gupta R, Srivastava OP. Effect of deamidation of asparagine 146 on functional and structural properties of human lens alphaB-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Jan;45(1):206-14.

- 31.- Kim YH, Kapfer DM, Boekhorst J, Lubsen NH, Bächinger HP, Shearer TR, David LL, Feix JB, Lampi KJ. Deamidation, but not truncation, decreases the urea stability of a lens structural protein, betaB1-crystallin. *Biochemistry*. 2002 Nov 26;41(47):14076-84.
- 32.- Williams-Ashman HG, Wilson J, Beil RE, Lorand L. Transglutaminase reactions associated with the rat semen clotting system: modulation by macromolecular polyanions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977 Dec 21;79(4):1192-8.
- 33.- Masters PM, Bada JL, Zigler JS Jr. Aspartic acid racemization in heavy molecular weight crystallins and water insoluble protein from normal human lenses and cataracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Mar;75(3):1204-8.
- 34.- Fujii N, Shimo-Oka T, Ogiso M, Momose Y, Kodama T, Kodama M, Akaboshi M. Localization of biologically uncommon D-beta-aspartate-containing alphaA-crystallin in human eye lens. *Mol Vis*. 2000 Feb 21;6:1-5.
- 35.- Ueda Y, Duncan MK, David LL. Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Jan;43(1):205-15.
- 36.- Thampi P, Hassan A, Smith JB, Abraham EC. Enhanced C-terminal truncation of alphaA- and alphaB-crystallins in diabetic lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Oct;43(10):3265-72.
- 37.- Jimenez-Asensio J, Colvis CM, Kowalak JA, Douglas-Tabor Y, Datiles MB, Moroni M, Mura U, Rao CM, Balasubramanian D, Janjani A, Garland D. An atypical form of alphaB-crystallin is present in high concentration in some human cataractous lenses. Identification and characterization of aberrant N- and C-terminal processing. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32287-94.

- 38.- Takemoto L, Boyle D. Increased deamidation of asparagine during human senile cataractogenesis. *Mol Vis*. 2000 Sep 5;6:164-8.
- 39.- Ma Z, Hanson SR, Lampi KJ, David LL, Smith DL, Smith JB. Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry. *Exp Eye Res*. 1998 Jul;67(1):21-30.
- 40.- Lampi KJ, Ma Z, Hanson SR, Azuma M, Shih M, Shearer TR, Smith DL, Smith JB, David LL. Age-related changes in human lens crystallins identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Exp Eye Res*. 1998 Jul;67(1):31-43.
- 41.- Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, Lubsen NH, Slingsby C, Tardieu A. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov;86(3):407-85.
- 42.- Brown N. Cataract in childhood: photograph methods in assessment. *Br J Ophthalmol*. 1977 Feb;61(2):135-40. Cataract in childhood: photograph methods in assessment.
- 43.- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol*. 1993 Jun 1;3(6):327-32.