

Anticuerpos contra proteínas del cristalino en pacientes con cataratas

Javier Marrugo, Patricia Amarís, Luis Caraballo

Con el fin de establecer la prevalencia de los anticuerpos contra los antígenos del cristalino en diversos grupos de pacientes con y sin cataratas y si existen diferencias significativas entre éstos y un grupo control, estudiamos por la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony los sueros de 37 pacientes con cataratas seniles, dos pacientes diabéticos con cataratas, 11 diabéticos sin cataratas, seis afáquicos y como controles 33 personas sanas, encontrándose la presencia de anticuerpos en 18.1 % de individuos sanos, en 81.08% y 81.8% de pacientes con cataratas seniles y diabéticos sin cataratas respectivamente ($P < 0.001$). Además el análisis molecular del extracto antigénico por medio de la técnica de SDS-PAGE reveló la presencia de nueve fracciones con pesos moleculares comprendidos entre 80KD y 16KD siendo el de 50KD el más antigénico con los sueros probados por western-blot.

INTRODUCCION

Las cataratas son la causa más común de opacidad del cristalino en el humano. Aproximadamente 17 millones de personas presentan esta alteración ocular (1). En el Hospital Universitario de Cartagena se extraen cerca de 200 cristalininos al año por esta enfermedad. No se dispone de medios preventivos o que retarden eficazmente su progresión. Desde 1927, Woods y Burky sugirieron que la cataratogénesis era un fenómeno

autoinmune (2). Posteriormente Hacket y Thompson trataron de demostrar el papel que juegan los anticuerpos contra el cristalino en la patogénesis de las cataratas en animales de experimentación (3). Recientemente I. Angunawela en estudios realizados en Sri Lanka demostró un incremento significativo de los anticuerpos contra el cristalino en el suero de pacientes con cataratas y en el suero de pacientes diabéticos. La controversia sobre la importancia de estos anticuerpos en la patogénesis de las cataratas radica en que aproximadamente 50% de las personas normales tiene anticuerpos contra los antígenos del cristalino (1, 6). La idea de que los componentes del cristalino fueran antigénicos fue sugerida por Uhlenhuth hace más de 80 años (4). Se ha propuesto que el hecho de que las proteínas del cristalino estén "secuestradas" del sistema inmune en periodos iniciales del desarrollo embrionario impide que induzcan tolerancia inmunológica (5). La presencia de cristalininas en el humor acuoso y el desarrollo de tolerancia inmunológica a estos autoantígenos sugiere que el fenómeno de tolerancia activa previene la aparición de una reacción autoinmune severa (6). Desde el punto de vista bioquímico el cristalino está compuesto por 65% de agua y 35% de proteínas, las cuales se dividen en dos grupos: las cristalininas solubles y el albuminoide insoluble. Las cristalininas en campo eléctrico se pueden dividir en alfa, beta y gamma, siendo las alfa-cristalininas el principal componente antigénico. Las propiedades antigénicas de las proteínas del cristalino son organoespecíficas, es así como al inocular animales de experimentación con proteínas del cristalino de una especie diferente se producen cambios inflamatorios en el cristalino del

Dr. Javier Marrugo, Dra. Patricia Amarís: Laboratorio de Inmunología, Universidad de Cartagena; Dr. Luis Caraballo: Departamento de Oftalmología, Universidad de Cartagena.

Solicitud de separatas al Dr. Marrugo.

animal inoculado, lo que sugiere que la configuración de las proteínas del cristalino particularmente las alfa cristalininas son muy similares en diferentes especies (7, 8). En los últimos años se ha pensado en la posibilidad de que una reacción autoinmune pueda ser responsable de la formación de cataratas en el humano (1,2, 6). Esto ha podido demostrarse parcialmente en diferentes estudios gracias a la utilización de técnicas inmunológicas bastante sensibles y específicas que han permitido poner en evidencia la existencia de anticuerpos contra proteínas del cristalino de manera significativa en la población con cataratas (1,3). Estudios recientes en ratones han establecido que los cambios covalentes que ocurren en la alfa-cristalinina durante el proceso de cataratogénesis producen un incremento de la afinidad de los autoanticuerpos por ésta, fenómeno similar al que ocurre en las cataratas seniles en humanos (14). Sin embargo, todavía quedan muchos aspectos hereditarios (9), condiciones metabólicas y ambientales que puedan influir sobre su producción.

MATERIAL Y METODOS

Cristalinos. Los cristalinos humanos se obtuvieron de pacientes a los cuales se practicó extracción por cataratas. Los cristalinos fueron colocados en PBS pH 7.4, congelados y almacenados a -70°C hasta el momento de la preparación del extracto antigénico.

Sueros de los pacientes. Se recolectaron muestras de sueros de cinco diferentes grupos de pacientes distribuidos de la siguiente manera:

Grupo 1: 37 pacientes con cataratas seniles.

Grupo 2: dos pacientes diabéticos con cataratas.

Grupos 3: 11 pacientes diabéticos sin cataratas.

Grupo 4: seis pacientes afáquicos faquectomizados tres a 12 meses antes y con un período de tres a 12 meses de haberseles extraído las cataratas.

Grupo 5: 33 personas sanas.

Los pacientes se escogieron de la Consulta Externa de Oftalmología del Hospital Universitario de Cartagena, de ambos sexos y cualquier edad a cada paciente se le tomaron 10 cc de sangre en tubo seco y el suero se conservó a -20°C hasta

el momento de su utilización. Los controles se obtuvieron de trabajadores sanos del Hospital Universitario y de estudiantes de un colegio de Cartagena.

Preparación del antígeno. Se tomaron 10 cristalinos, se descongelaron y luego se colocaron en un homogenizador de vidrio con 10 ml de PBS tween 20 al 1%, se maceraron hasta obtener una suspensión lechosa. El homogenizado se centrifugó a 3.000 g por 30 minutos. El sobrenadante se dializó contra PBS pH 7.4 durante 48 horas a temperatura ambiente y se guardó a -70°C hasta el momento de su uso.

Medición de la concentración de proteínas del extracto antigénico. La concentración de proteínas se determinó por el método de BIO-RAD, y ésta fue de 6 mg/mL.

Doble difusión en gel de agarosa. Este método descrito por Ouchterlony (1949) se utilizó para detectar la presencia de anticuerpos contra el extracto de cristalino. Se prepararon placas con una solución de agarosa al 1.5% (Fisher Scientific) la cual fue hecha en buffer PBS pH 7.4. A la solución se le agregó azida de sodio (0.01 g) para evitar la contaminación. A cada plato para la difusión (6x6 cm) se le agregaron 8 ml de la solución de agarosa y se dejó solidificar a temperatura ambiente, luego se le practicó un orificio de 5 mm de diámetro central para el antígeno y seis periféricos de 3 mm de diámetro para los sueros. En el pozo central se colocaron 100 uL de solución del antígeno a una concentración de 6 mg/mL y los sueros se colocaron en los pozos periféricos, los platos se cubrieron y se incubaron durante 72 horas a 37°C , las bandas de precipitado se observaron al cabo de este tiempo. Las placas se colorearon con azul brillante de coomassie (Figura 1).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Esta se llevó a cabo en un gel vertical de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes durante una hora a 300 voltios, luego se coloreó con azul brillante de coomassie y plata, se secó y se fotografió para análisis posterior.

Western blot. Después de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDA-PAGE) se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas a un

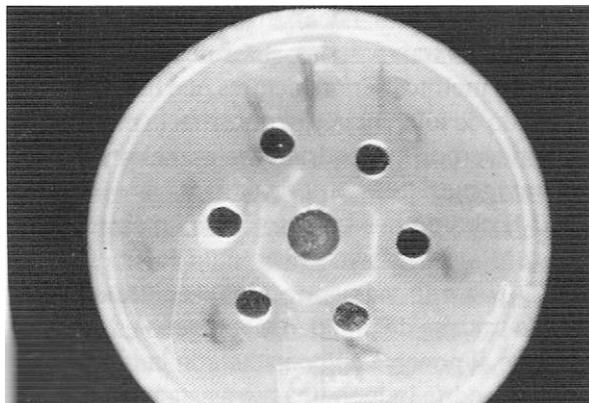


Figura 1. Bandas de precipitado observadas después de 72 Horas de difusión entre los sueros de los pacientes y el extracto de antígeno de cristalino.

filtro o de nitrocelulosa utilizando 100 voltios durante dos horas. Seguidamente se incubaron las tiras del filtro con los diferentes sueros positivos previamente seleccionados por ELISA o inmunodifusión) durante 18 horas a 4°C. Posteriormente se practicaron cuatro lavados con PBS tween 20 y se agregó el conjugado durante una hora a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se agregó la solución reveladora que permitió la visualización de las diversas bandas antigénicas a las que se les pudo determinar su peso molecular mediante estándares.

Análisis de los datos. Los resultados fueron analizados utilizando un microcomputador y el programa de bioestadística Tadpole (Elsevier-Biosoft).

RESULTADOS

Doble inmunodifusión. Se estudió por este método el suero de 37 pacientes con cataratas seniles, dos diabéticos con cataratas, 11 diabéticos sin cataratas, seis afáquicos con menos de un año de la extracción del cristalino y 33 controles sanos. La doble inmunodifusión se llevó a cabo en presencia del extracto antigénico el cual tenía una concentración de proteínas de 6 mg/ml, las bandas de precipitado aparecieron al cabo de 72 horas y fueron observadas durante varios días; posteriormente las placas fueron coloreadas con azul brillante de coomassie para conservarlas (Figura 1).

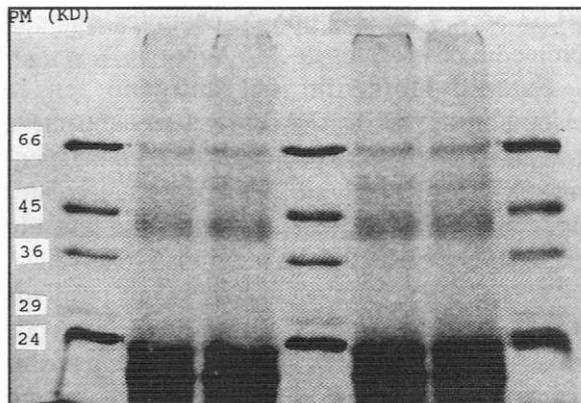


Figura 2. Electroforesis en SDS-PAGE al 12%, en donde se observan las diversas bandas del extracto antigénico de cristalino. Coloración con plata y azul brillante de coomassie.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1. Se encontró que 81.08% (30 de 37) de los pacientes con cataratas seniles tenían anticuerpos contra las proteínas del cristalino. El 81.8% (9 de 11) de pacientes diabéticos sin cataratas también tenía una reacción positiva. En el grupo de los afáquicos presentaron anticuerpos 63.63% (4 de 6) y los dos pacientes diabéticos estudiados todos presentaron anticuerpos contra el cristalino. De los 33 controles sanos seis (18.1%) fueron positivos. Esto mostró una gran diferencia entre el grupo de pacientes y los controles ($P < 0.0001$).

Las edades promedio por grupos de pacientes fueron las siguientes: los pacientes con cataratas seniles tenían un promedio de 63.57 años, los diabéticos con cataratas 57 años, los diabéticos sin cataratas 60.37 años, el grupo de los afáquicos

Tabla 1. Resultados de la doble inmunodifusión en gel utilizando los sueros de los pacientes contra el antígeno del cristalino.

Tipo de paciente	N	Promedio edad (años)	No. de Positivos	(%) Positivos
Catarata senil	37	63.57	30	81.08*
Diabético con catarata	2	57	2	100
Diabético sin catarata	11	60.37	9	81.8
Afáquicos	6	63.63	4	66.66
Controles sanos	33	25.72	6	18.1*

* $\chi^2 = 25.16$ $P < 0.0001$.

63.63 años y en el grupo de controles sanos el promedio de edad fue de 25.72 años.

Estudio molecular del antígeno: en la electroforesis por SDS-PAGE se observaron nueve bandas con pesos moleculares comprendidos entre 80KD y 16KD (Figura 2), los pesos moleculares de cada banda fueron establecidos usando estándares y calculando la movilidad relativa.

Western-blot. Utilizando siete sueros positivos de pacientes con cataratas seniles se encontró que cinco de estos sueros presentaron reacción positiva con la fracción de 50 KD, cuatro presentaron reacción solamente con esta banda y uno con las bandas de 36, 39, 48 KD. Un suero perteneciente al grupo de diabéticos sin cataratas no dio ninguna reacción.

DISCUSION

La presencia de anticuerpos contra los antígenos del cristalino se demostró en pacientes con cataratas seniles, diabéticos con y sin cataratas, afáquicos y controles sanos, por la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony. Encontramos que 81.08% de los pacientes con cataratas seniles y con promedio de edad de 63.57 años presentaban anticuerpos contra los antígenos, dato muy similar al revelado por otros estudios (1,3). En el grupo de pacientes diabéticos con edad promedio de 60.37 años la incidencia de anticuerpos fue de 81,8%; lo que sugiere, que la diabetes mellitus podría ser un factor importante en la aparición de anticuerpos contra el cristalino, probablemente debido a un aumento de la permeabilidad de la membrana basal (10). Es importante tener en cuenta lo anterior por la alta frecuencia de cataratas en diabéticos, conocida desde hace muchos años (11,12). La diferencia entre el grupo de pacientes con cataratas seniles y controles sanos fue altamente significativa ($P < 0.0001$), con relación al grupo de pacientes diabéticos se encontró una diferencia similar, pero el pequeño número de pacientes no permite obtener ninguna conclusión.

La presencia de anticuerpos contra el cristalino en 18.1% de controles sanos, con promedio de edad de 25,72 años sugiere la posibilidad de que estos pacientes podrían desarrollar cataratas, en el

futuro, lo anterior hace pensar que el envejecimiento, los traumas, las enfermedades como la diabetes mellitus serían factores que harían perder el estado de tolerancia y permitirían la producción de anticuerpos que podrían acelerar el proceso de cataratogénesis.

El hecho de que en los sueros analizados por Western-blot se haya encontrado la fracción de 50KD como la más antigénica, sugiere que éste podría tratarse de uno de los antígenos secuestrados que al ponerse en contacto con la circulación general podría inducir una respuesta inmune. Este contacto podría estar desencadenado por trauma, radiación o un simple aumento de la permeabilidad de la membrana del cristalino.

La otra pregunta que habría que responder es la de por qué algunos individuos responden a otras moléculas del cristalino? Esto se podría deber a diferencias genéticas, teniendo en cuenta que la respuesta inmune es un fenómeno controlado genéticamente por el sistema HLA. Un estudio realizado por un grupo de investigadores encontró una asociación negativa entre el alelo HLA Aw26 y la cataratogénesis, hallazgo sugestivo de que este alelo podría estar en desequilibrio de ligamiento negativo con el gen de susceptibilidad para esta enfermedad (13), pero fue un estudio en donde la tipificación se hizo por serología y no se detectó la respuesta inmune a los antígenos específicos del cristalino. Para futuros estudios en que se pretenda establecer una asociación entre HLA y la respuesta autoinmune contra los antígenos del cristalino sería necesario estudiar el HLA a nivel del DNA y la respuesta autoinmune contra antígenos específicos del cristalino mediante la técnica de western-blot.

Concluyendo, los autoanticuerpos contra los antígenos del cristalino detectados tanto en pacientes con cataratas como en diabéticos abren la posibilidad de que algún mecanismo inmunológico (depósito de complejos inmunes) sea el responsable de la cataratogénesis. si en un futuro se pudiera establecer si realmente la respuesta inmune contra el cristalino se encuentra controlada genéticamente, se podrían hacer planes preventivos detectando precozmente a las personas sus-

ceptibles de padecer cataratas y poder evitar la morbilidad producida por esta enfermedad.

SUMMARY

In order to establish the presence of serum antibodies against lens proteins and the possible role of autoimmune phenomena in the pathogenesis of cataract, 37 patients with senile cataract, 2 patients with diabetes mellitus with cataract, 11 diabetic patients without cataract, and 33 healthy controls were studied. Antibodies were detected by using double diffusion in agarose as described by Ouchterlony. It was found that 18.1 % of healthy individuals had antilens antibodies; in contrast, the prevalence of such antibodies among patients with senile cataracts and diabetics without cataracts was 81.08% respectively ($p < 0.001$). In addition, SDS-PAGE performed to the lens extract revealed nine reproducible bands with molecular weights between 16 KD and 80 KD. Immunoblotting procedures allow us to demonstrate that the 50 KD band was the most frequently detected by positive sera from patients and controls.

AGRADECIMIENTOS

A ICFES, Colciencias y a la Universidad de

Cartagena por el apoyo financiero que brindaron para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

1. **Anguna wela II.** The role of autoimmune phenomena in the pathogenesis of cataract. *Immunology* 1987; **61**: 363-368.
2. **Woods AC, Burky EL.** *J Am Med Assoc* 1927; **89**: 102-109.
3. **Hackett E, Thompson A:** Antilens antibody in human sera. *Lancet II* 1964; 663-666.
4. **Uhlehuth P. In:** Gestschrift zum Sechzigsten Geburtstag von Robert Koch, Gustav. Fischer, *Jena*; **1903**: 49.
5. **Marak GE, Lim LY, Rao NA.** *Ophthalmic Res* 1982; **14**: 176-181.
6. **Niederkon J.** Is cataract formation an autoimmune phenomenon?. *Immunology Today* 1987; **8(11)**: 323.
7. **Olson Lance.** Anatomy and Embriology of the lens in clinical ophthalmology. Duane Thomas Ed, 1988; 71.
8. **Maski, Haibert SP, Javier P.** Comparison of rabbit antilens antibodies induced by *iso* and *hetero* immunization, *Ann NY Acad Sci* 1965; **124**- 352.
9. **Meakin S, et al.** Crystallins of the human Eye Lens: Expresión Analysis of five members of the gene family molecular and cellular Biology 1987; **8**: 2671-2679.
10. **Farnsworth, et al.** Diabetic cataratacs in the rhesus monkey lens. *Metabol Ped* 1980; *Ophtal* 4,31.
11. **Caird FI.** Problems of cataract epidemiology with special reference to diabetes. In: The humans lens in relation to cataract. Ciba Foundation symposium (ed. A. Pirie). Elsevier/North Holland. Amsterdam 1973; 281.
12. **Ederer, et al.** Senile lens changes and diabetes in two population studies. *Am J Ophthalmology* 1981; 91-381.
13. **Bianchi PE, Martineti M, Salati R, Poma R, Cuccia M, Trimarchi F.** Aging Cataract and HLA Histoglobulins; European Histocompatibility Conference 1990: (Abst. 89a).
14. **Takemoto L, Horwitz J, Kuck K:** A covalent change in alpha crystallin during opacification of Emory mouse lens. *Lens. Eye. Toxic Res* 1989; **6(3)**: 431-441.