

616.075  
U 47  
1997  
e

INFORME FINAL  
PROYECTO FONTEC N° 95-0703  
"TRATAMIENTO ULTRASONICO DE LA CATARATA"

ULTRATECH S.A.  
30 DE JULIO DE 1997

BIBLIOTECA CORFO

616.075  
U 47  
1997

2262

# INFORME FINAL PROYECTO FONTEC N° 95-0703 "TRATAMIENTO ULTRASONICO DE LA CATARATA"

## 1.-RESUMEN EJECUTIVO.

### **Antecedentes de la Empresa.**

Ultratech S.A. es una empresa que centra su actividad en proyectos de innovación tecnológica cubriendo estos tanto el área médica, como geológico-minera y de prospección de recursos naturales. Se encuentra formalmente constituida desde noviembre de 1994.

### **El proyecto tecnológico.**

Nombre del Proyecto:	Tratamiento ultrasónico en la enfermedad catarata.
Empresa Solicitante:	Ultratech S.A.
Entidad Ejecutora:	Ultratech S.A.
Localización del Proyecto:	Quinta Región.

**Resumen:** Mediante la aplicación de técnicas ultrasónicas de aplicación directa sobre el ojo, se espera revertir el proceso de precipitación de proteínas causante de la opacidad en la enfermedad de catarata, transformando los tratamientos quirúrgicos e invasivos en ambulatorios y no invasivos. Se modelará la interacción entre ondas ultrasónicas y la estructura química y biofísica del cristalino, encontrándose las frecuencias de resonancia que logren revertir la opacificación, diseñándose a continuación los actuadores necesarios para realizar las pruebas y validar el modelo.

### **Impacto técnico - económico.**

Los motivos técnico económicos que originan la **necesidad, conveniencia y oportunidad** de implementar el proyecto propuesto pueden resumirse como sigue:

**Necesidad:** Existe hoy en día, no solamente en nuestro país sino que además en el mundo, una gran cantidad de personas que sufren o sufrirán de catarata, y que según las estadísticas podrían alcanzar alrededor de un 60% de la

población. Los costos asociados al tratamiento quirúrgico por una parte, (con un costo de 30 millones de dólares anuales solamente en nuestro país) y a la gran necesidad social por la otra, (un porcentaje importante de los enfermos no pueden tratarse por el alto costo asociado a la operación) hacen que este proyecto sea no sólo un proyecto productivo, sino que además presente una importante componente social.

**Conveniencia:** Desde todo punto de vista es altamente conveniente contar con un sistema no invasivo en el tratamiento de la catarata, ya que de esta manera se impone, por una parte, una nueva forma de mirar el aspecto tratamiento de esta enfermedad (sistema altamente competitivo con respecto a todas las otras técnicas existentes, todas ellas de carácter invasivo) y, por otra parte, se pone al alcance de un mayor número de personas esta posibilidad de tratamiento al ser de un costo comparativo mucho menor.

**Oportunidad:** Al ser exitoso el proyecto se obtendría por una parte un producto de alto interés comercial, ( ya que podrían desarrollarse clínicas de tratamientos no quirúrgicos para la catarata) lo que habla de su sentido productivo, y por otra parte, la oportunidad de hacerlo es ahora, ya que este sistema se basa para su desarrollo en una fase I previamente desarrollada y co-financiada por FONTEC cuyo título es "Optimización del diagnóstico en la enfermedad catarata" el cual se acopla con este nuevo sistema al permitir evidenciar de una manera cuantitativa los cambios producidos en las opacidades del cristalino bajo la acción del campo ultrasónico.

## **2. EXPOSICION DEL PROBLEMA.**

El problema que enfrentaba la empresa y que justificó la ejecución del proyecto tecnológico guarda relación con el resultado obtenido durante el desarrollo de la primera fase de este proyecto mencionado en el punto anterior. Es estrictamente necesario contar con un sistema objetivo de análisis del diagrama de opacificación para examinar cuantitativamente cualquier variación de dicho diagrama frente a cambios introducidos por el agente no invasivo de tratamiento de la catarata, en este caso, el agente ultrasónico.

### **Objetivos Técnicos:**

El resultado específico que se espera lograr con la ejecución de este proyecto es el diseño de un sistema ultrasónico de tratamiento de la enfermedad de catarata. Se pretende con este sistema revertir el proceso de precipitación de proteínas causante de la opacidad transformando en no invasivo un sistema actualmente quirúrgico.

### **Tipo de innovación:**

El tipo de innovación que busca desarrollar la empresa se enmarca en lo siguiente:

**Mejora significativa de procesos:** Todos los procesos de tratamiento en la enfermedad de catarata derivan ineluctablemente en tratamiento quirúrgico, al ser reemplazado el cristalino opacificado por una prótesis artificial. Hace algún tiempo la técnica más usual era la intracapsular, en el curso de la cual eran retirados a la vez el cristalino y su cápsula. La otra técnica, hoy cada vez más empleada, es la llamada extracapsular, en la cual el cristalino es retirado y la parte posterior de la cápsula mantenida in situ. Independientemente de la técnica escogida (ambas quirúrgicas) nuestra propuesta generará un sistema de tratamiento no invasivo (este es el punto innovativo) y de menor costo (lo que lo hace altamente competitivo ya que no requiere cirugía).

**Implementación de nuevos procesos:** Dentro de este punto está contemplado el diseño de una nueva metodología a seguir en el tratamiento de la catarata, ya que se hará incidir directamente la radiación ultrasónica sobre el ojo, eliminando de esta manera completamente todo aspecto quirúrgico.

**Desarrollo de una nueva línea de productos y servicios:** La implementación de este proyecto generaría toda una nueva línea de productos (transductores ultrasónicos) y servicios (tratamiento no invasivo) que no existen en este momento en el mercado con una aplicación específica tal como es curar la enfermedad de catarata.

**Mejora importante de servicios existentes:** El servicio que puede ofrecer este sistema de tratamiento no invasivo tiene claras ventajas comparativas con respecto a las alternativas existentes hoy en día, entre las que se puede citar, entre otras,:

- a) **Menor costo asociado al tratamiento:** Lo que lo hace más accesible a un mayor número de personas.
- b) **No invasividad:** Lo que evita el problema de rechazo de ciertos órganos a la acción quirúrgica.
- c) **Mayor calidad de servicio:** El sistema a ser diseñado proporciona por su naturaleza una mayor velocidad en el tratamiento de la opacidad.

La cuantificación de los beneficios esperados con la implementación del proyecto en su etapa productiva, puede establecerse en los siguientes dos órdenes; el primero de ellos, dice relación con el beneficio operacional conseguido al tratar de una manera no invasiva todo el sistema ocular en general, y el cristalino en particular. El segundo guarda relación con el beneficio económico obtenido al patentar este sistema de tratamiento. En resumen, los beneficios son tanto operacionales como comerciales.

### **3. METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO.**

La metodología seleccionada para alcanzar los objetivos técnicos anteriormente señalados puede establecerse como sigue:

- a) Recopilación de los antecedentes oftalmológicos que caracterizan física y bioquímicamente el cristalino y todo su entorno, vale decir córnea, humor acuoso, iris, pupila, humor vítreo y retina.
- b) Estudio y modelación computacional de la interacción de ondas ultrasónicas con la estructura arquitectónica del cristalino.
- c) Diseño de los actuadores ultrasónicos necesarios para lograr el efecto de reversión del proceso de precipitación de proteínas causante de la opacidad del cristalino.
- d) Prueba y validación del modelo propuesto. Uso de software diseñado en proyecto anterior presentado y aprobado por FONTEC de "Optimización del diagnóstico en la enfermedad de catarata" para evidenciar los cambios de opacidad resultantes sobre el cristalino producto de la acción ultrasónica.

## **Programa de Ejecución:**

El proyecto está contemplado para una duración de 18 meses. El plan de trabajo seguido con la secuencia cronológica de las etapas fue el siguiente:

### **De cero a cuatro meses: (Desde el 01/01/96 al 30 /04/96)**

En líneas generales estos meses estuvieron dedicados al estudio de la geometría del cristalino y su entorno. Se acotó el problema con la información existente para ser resuelto generando un primer modelo de la situación real, esto con el fin de ir logrando una aproximación gradual sobre el problema y sus variables asociadas, e ir sumando nuevas variables hasta minimizar la distancia existente entre el modelo generado y la situación real. En particular los problemas que se desarrollaron son los siguientes:

- i) Obtención teórica de las constantes elásticas (velocidad de transmisión y coeficiente de absorción) de los elementos involucrados (córnea, humor acuoso, cristalino, humor vítreo, retina). *Con respecto a este punto es preciso mencionar que el sentido de la obtención teórica de las constantes elásticas es que no se encuentran disponibles como información consultable y es forzoso entonces, al no poseer la infraestructura de laboratorio que se necesitaría para su determinación experimental, que se recurra al cálculo teórico de estos valores. Asimilando las distintas componentes del sistema (córnea, humor acuoso, cristalino, humor vítreo, retina) como sólidos, líquidos o combinaciones lineales de ambos (por ejemplo, el humor vítreo es considerado como un líquido de alta viscosidad, y en este sentido, para ciertos cálculos es considerado como un sólido), se han determinado teóricamente las velocidades de transmisión y los coeficientes de absorción de los diferentes elementos como función de la frecuencia. Esto es de primera importancia, ya que en la búsqueda de la resonancia del sistema se debe contar con estos valores a la frecuencia específica en la cual se va a trabajar con los transductores ultrasónicos.*
- ii) Estudio de sensibilidad del sistema frente a perturbaciones mecánicas del medio. *Con respecto a este punto debe decirse que el sistema anteriormente considerado presenta, al primer orden, una sensibilidad que es lineal con la frecuencia, aún cuando no es descartado el hecho que presente alta sensibilidad local en ciertos rangos de frecuencia, pero esto es objeto de estudios posteriores sobre el tema.*

iii) Estudio de las interfases sólido-líquido (córnea-humor acuoso) y líquido-sólido (humor acuoso-cristalino) en los coeficientes de transmisión y reflexión de las ondas ultrasónicas. *En este punto puede mencionarse que el estudio relativo a los coeficientes de transmisión y reflexión de las distintas componentes del sistema se encuentra en su estado final, ya que al haberse modelado la cantidad de energía incidente que ha sido absorbida, puede ser conocida la energía reflejada, ya que la energía incidente es un valor conocido a priori, al estar dado por la potencia utilizada.*

*A modo de facilitar la comprensión teórica se indica a continuación el sustrato teórico sobre el que se ha trabajado para el caso ultrasónico.*

### ***Reflexión y transmisión en la incidencia normal con un plano límite de separación de dos medios.***

*Si consideramos un haz de ondas planas que inciden normalmente sobre un plano límite que separa dos medios, por ejemplo, córnea y humor acuoso, de impedancias características,  $R_1$  y  $R_2$  respectivamente, en general parte de la energía sonora incidente se reflejará en la córnea y el resto se transmitirá hacia el humor acuoso. Sean  $p_i$ ,  $p_r$ ,  $p_t$ , los valores de las presiones acústicas de las ondas incidente, reflejada y transmitida, respectivamente, y  $\xi_i$ ,  $\xi_r$  y  $\xi_t$  los valores correspondientes de las velocidades de las partículas. Si las ondas presentan forma sinusoidal y el medio es no absorbente (condición de máxima potencia reflejada), tenemos:*

$$p_i = A_1 \text{sen}(\omega t - k_1 x) = \xi_i R_1 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$p_r = B_1 \text{sen}(\omega t + k_1 x) = -\xi_r R_1 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$p_t = A_2 \text{sen}(\omega t - k_2 x) = \xi_t R_2 \quad (\text{Ec. 3})$$

*Los símbolos  $A_1$ ,  $B_1$  y  $A_2$  representan las amplitudes de presión y  $k_1$  y  $k_2$  los números de onda,  $2\pi / \lambda$ , para los dos medios. "x" es positivo en la dirección del haz incidente. El cambio de signos en la ecuación 2 afectando tanto a "x" como a  $R_1$  indica que la onda reflejada avanza según la dirección negativa de "x".*

En el plano límite entre la córnea y el humor acuoso (o el humor acuoso y el cristalino) se deben satisfacer en todo instante las siguientes condiciones:

a) Con objeto de mantener la continuidad, la presión en el plano límite debe ser la misma en ambos lados, es decir:

$$p_t = p_i + p_r \quad (\text{Ec. 4})$$

b) Las velocidades de partícula normales al plano límite deben ser iguales a ambos lados, ya que de otra forma los dos medios no permanecerían por más tiempo continuamente en contacto entre sí, es decir:

$$\dot{\xi}_t = \dot{\xi}_i + \dot{\xi}_r \quad (\text{Ec. 5})$$

Haciendo en el plano límite  $x=0$ , las ecuaciones 4 y 5 se convierten en

$$A_2 = A_1 + B_1 \quad (\text{Ec. 6})$$

$$R_1 A_2 = R_2 (A_1 - B_1) \quad (\text{Ec. 7})$$

Así, pues,

$$\frac{p_t}{p_i} = \frac{A_2}{A_1} = \frac{2R_2}{(R_1 + R_2)} \quad (\text{Ec. 8})$$

$$\frac{p_r}{p_i} = \frac{B_1}{A_1} = \frac{(R_2 - R_1)}{(R_1 + R_2)} \quad (\text{Ec. 9})$$

y también

$$\frac{\dot{\xi}_t}{\dot{\xi}_i} = \frac{(A_2 R_1)}{(A_1 R_2)} = \frac{2R_2}{(R_1 + R_2)} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$\frac{\xi_r}{\xi_i} = -\frac{B_1}{A_1} = \frac{(R_1 - R_2)}{(R_1 + R_2)} \quad (\text{Ec.11})$$

Cuando  $R_2$  es mayor que  $R_1$ , es decir, para el sonido que pasa de un medio acústicamente menos denso a otro acústicamente más denso (en nuestro caso, del humor acuoso al cristalino), la Ec.9 muestra que la reflexión tiene lugar sin variación de fase de la presión acústica. Por otra parte, la Ec.11 pone de manifiesto que se produce un cambio de fase de 180 grados para la velocidad de las partículas y, por tanto, para su desplazamiento. En cambio, cuando  $R_2$  es menor que  $R_1$ , es decir, la radiación pasa de un medio más denso a otro menos denso, (en nuestro caso, de la córnea al humor acuoso) tiene lugar un cambio de fase de 180 grados en la presión acústica y no se produce variación de fase en la velocidad de las partículas y, por consiguiente, en su desplazamiento.

En el plano límite, (vale decir, en la interfase de separación entre ambos medios) la relación entre la intensidad acústica de la onda reflejada y la de la onda incidente define el coeficiente de reflexión,  $\alpha_r$ , y la relación entre la intensidad de la onda transmitida y la de la incidente se denomina coeficiente de transmisión,  $\alpha_t$ .

De las ecuaciones anteriores más las ecuaciones de energía para ondas ultrasónicas se puede deducir que:

$$\alpha_r = \left( \frac{(R_2 - R_1)}{(R_1 + R_2)} \right)^2 \quad (\text{Ec.12})$$

$$\alpha_t = \frac{4R_1R_2}{(R_1 + R_2)^2} \quad (\text{Ec.13})$$

Estas ecuaciones demuestran que, cuando  $R_1$  y  $R_2$  son iguales,  $\alpha_t$  alcanza su valor máximo, o sea la unidad, y  $\alpha_r$  se hace igual a cero. Estos son casos ideales, pero en la práctica se produce un buen acoplamiento acústico entre los medios cuando  $R_1$  y  $R_2$  poseen valores del mismo orden de magnitud, lo cual es aproximadamente nuestro caso, es decir, el valor de  $\alpha_t$  se encuentra

dentro del intervalo entre 0.1 y la unidad. Se experimenta un grado de acoplamiento pobre cuando los órdenes de magnitud de  $R_1$  y  $R_2$  difieren considerablemente, por ejemplo, si los dos medios son agua y acero, para cuyas impedancias características el coeficiente de transmisión  $\alpha_1$  tiene un valor aproximadamente de 0.1, que representa una pérdida tan sólo de 10 dB; esto significa que los dos medios se encuentran razonablemente bien acoplados. Por otra parte, si el agua se reemplaza por aire,  $\alpha_1$  se reduce hasta aproximadamente  $10^{-6}$ , que corresponde a una pérdida de 60 dB; esto constituye un ejemplo de acoplamiento extremadamente pobre (alta ganancia de reflexión).

iv) Determinación morfológica de las diferentes categorías en la distribución de opacidades. Las cataratas se clasifican según sus aspectos clínicos y evolutivos en:

**A) Cataratas congénitas.**

- 1) Catarata polar anterior.
- 2) Catarata polar posterior.
- 3) Catarata pulverulenta.
- 4) Catarata pulverulenta central.
- 5) Catarata zonular.

**B) Cataratas adquiridas.**

- 1) Catarata senil.
- 2) Catarata sintomática.
- 3) Catarata complicada.
- 4) Catarata traumática.
- 5) Catarata secundaria.

Describamos brevemente cada una de ellas en relación al punto iv).

**Catarata polar anterior:** Aparece como una mancha blanca en el polo interior del cristalino. En una forma típica designada como catarata piramidal, la opacidad empuja hacia el exterior de la cápsula.

**Catarata polar posterior:** La opacidad es establecida en el polo posterior del cristalino.

**Catarata pulverulenta:** Es caracterizada por la presencia de opacidades puntiformes coloreadas al gris-azul, rodeando el núcleo embrional.

**Catarata pulverulenta central:** Este tipo consiste de opacidades puntiformes blanquecinas que envuelven el núcleo embrional en una distribución más o menos uniforme.

**Catarata zonular:** Este es el tipo más común de catarata congénita. Una región transparente central es rodeada por una opacidad difusa, en general en forma de "V" lo que da una característica imagen "a horcajadas". Esta catarata puede permanecer estacionaria, pero más a menudo, después de un período de estabilidad llega a ser total.

**Catarata senil:** Dentro de este tipo de catarata cabe destacar:

**Catarata cortical:** Aquí los cambios de transparencia involucran todo el córtex del lente.

**Catarata subcapsular posterior:** En general este tipo de opacidades se desarrolla como entidades aisladas, comenzando primeramente en la región polar para luego esparcirse hacia la periferia.

**Catarata nuclear:** En un comienzo un crecimiento en la densidad óptica del núcleo tiene lugar (esclerosis nuclear)

**Catarata cristalina:** En ciertas instancias, cristales aparecen en el núcleo adulto o en el córtex del lente, casi siempre en asociación con otras opacidades. Los cristales cuando se observan en una lámpara de hendidura aparecen coloreados en diferentes tonos.

**Catarata intumesciente:** En estados avanzados es posible que el cristalino crezca en volumen debido a procesos de hinchamiento que envuelven el cortex.

**Catarata sintomática:** Este tipo de catarata representa la manifestación ocular de una enfermedad general. Las siguientes formas son las más recurrentes:

**Catarata diabética:** Su característica es su iniciación a temprana edad, su rápida evolución y su primitiva localización subcapsular posterior. En su forma típica aparece como una opacidad igual a un disco posterior.

**Catarata debida a tetania:** Ocurre en condiciones de hipocalcemia (hipoparatiroidismo) o en estados con metabolismo de calcio alterado. En general, las opacidades envuelven las capas corticales posterior y anterior.

**Catarata asociada con dermatosis:** Este tipo de catarata ocurre en concomitancia con condiciones de piel, con especial referencia a dermatosis crónica en individuos jóvenes y a escleroderma. En ciertos casos, la catarata involucra inicialmente la cápsula anterior, y aparece como una opacidad central irregular con bordes externos cóncavos.

**Catarata galactosa-inducida:** Es encontrada en el 75% de los casos con galactosemia y es bilateral. Las opacidades iniciales son corticales.

**Catarata complicada:** En este grupo la presencia de otras patologías (glaucoma, desprendimiento de retina) le da el nombre a este tipo de catarata. La catarata complicada en general es unilateral, y siempre evolutiva.

**Catarata traumática:** Este tipo se puede clasificar en:

**Catarata debida a contusión:** Un trauma contusivo en el globo ocular puede producir un anillo pigmentado (anillo de Vossius)

**Catarata debida a enrollamiento capsular:** A través de una rotura en la cápsula, el agua penetra el lente cristalino produciendo hinchamiento y opacificación de las fibras lenticulares. Consecuentemente, la masa lenticular tiende a ser reabsorbida.

**Catarata secundaria:** Consiste en la opacificación de remanentes lenticulares seguidos de procedimientos quirúrgicos para la extracción de catarata extracapsular. En la forma más común, una membrana opaca se desarrolla desde la cápsula posterior residual.

v) Conceptualización de las diferentes fases que configuran el desarrollo del software, desde la idea primaria siguiendo con la definición de los objetivos y su especificación (elementos, propiedades, relaciones, operaciones, interacción). En este punto el avance correspondió completamente de acuerdo a lo presupuestado, ya que se posee la estructura algorítmica y su reducción a elementos de programa que dan el fondo de desarrollo conceptual necesario sobre el que se construirá el diseño final. Este desarrollo contempla las diferentes interacciones entre el campo ultrasónico y los diversos estratos biofísicos a través de los cuales viajan estas señales.

vi) Determinación bioquímica del conjunto de proteínas generadoras de la distribución de opacidades. El conjunto de proteínas del cristalino se puede clasificar como solubles (cristalinas  $\alpha$   $\beta$  y  $\gamma$ ) y proteínas insolubles (albuminoides)

a) *Alfa-cristalinas*: Formadas por 40 a 50 cadenas de polipéptidos, presentan un PM de 800.000 a 1.000.000 D. Son más abundantes en la región cortical. Probablemente son convertidas a albuminoides en el interior del cristalino.

b) *Beta-cristalinas*: Presentan un PM de 50.000 a 500.000 D.

c) *Gama-cristalinas*: Presentan un PM de 20.000 D. Se encuentran en gran cantidad sólo en cristalinos de individuos jóvenes siendo mayor su concentración en el núcleo de éste. Es una crioproteína (precipita bajo los 25°C (catarata por frío)).

d) *Albuminoides*: Es una mezcla de proteínas. El 90% son insolubles. Derivan de las alfa-cristalinas por agregación y cambios en la estructura.

e) *Otras*: Glicoproteínas (en membranas celulares), nucleoproteínas, lipoproteínas, citocromos, y flavoproteínas. Se ubican en la corteza y en el epitelio del cristalino.

vii) *Estudio de la fisioanatomía de la córnea y el cristalino*. En este punto se han reunido los antecedentes necesarios (vía publicaciones especializadas sobre el tema) requeridos para acoplarlos con los antecedentes ultrasónicos, en términos del modelamiento entre estas ondas mecánicas y la anatomía de los subsistemas a través de los cuales viajan las ondas ultrasónicas (córnea, humor acuoso y cristalino). Dentro de este contexto cabe destacar lo siguiente:

**Aspectos morfológicos de la córnea y del cristalino mediante microscopía electrónica de barrido.**

Aunque la microscopía óptica (MO) y la microscopía electrónica de transmisión (MET) son esenciales para el análisis *in vitro* del cristalino y de la córnea, la información que proporcionan es para un área tan restringida y específica que, a menudo, se necesitan varias secciones histológicas para obtener la información deseada. Es posible encontrar una solución viable a este problema utilizando la microscopía electrónica de barrido, técnica que permite visualizar extensas zonas de tejido ocular para determinar qué áreas deben estudiarse mediante MO y MET para conseguir la máxima información necesaria. En el estudio del cristalino se ha comprobado la importancia del estudio tridimensional de las estructuras, al descubrirse la existencia de fibras hexagonales perfectas similares a una estructura cristalina típica. Esto es de gran importancia, ya que el paso de ondas de ultrasonido a través

*de redes cristalinas es un fenómeno estudiado hoy en día con gran detalle, lo que valida el uso de estas técnicas en su interacción con tejidos biológicos.*

Durante el período comprendido entre cinco y doce meses y de trece a diecinueve meses se desarrollaron los siguientes temas:

**De cinco a doce meses: (Desde el 01/05/96 al 31 /12/96)**

**De trece a diecinueve meses: (Desde el 01/01/97 al 31/07/97)**

a) Simulación de la interacción ultrasónica en distintas combinaciones de frecuencia y potencia con la arquitectura del cristalino.

*Se ha estudiado en amplio detalle la arquitectura del cristalino en términos de su estructura, superestructura, estabilidad y genética. Las células epiteliales del cristalino sufren elongación y pérdida de organelos transformándose en células fibrilares, las que son básicamente un contenedor de proteínas. El cristalino requiere energía para su crecimiento, sus mecanismos de reparación, y la mantención de su transparencia. Para esto se usa fundamentalmente glucosa, de la que un 78% pasa a la vía de la glicólisis anaeróbica, aproximadamente un 4% pasa al ciclo de la pentosa monofosfato, un 5% a la vía del sorbitol, y sólo un 3% al ciclo del ácido cítrico (sólo en las células epiteliales, pues las fibrilares no tienen mitocondrias). Este último aporta el 20-30% del ATP total del cristalino.*

*En la estabilidad de las proteínas participan factores intrínsecos, extrínsecos, y cambios posttranslacionales. ( Este punto es de particular importancia ya que está relacionado directamente con la estabilidad de la solución generada ultrasónicamente. El cambio en el índice de refracción del medio, dado por la incidencia de radiación ultrasónica en distintas combinaciones de frecuencia y potencia, es signo de que han ocurrido cambios estructurales al interior del cristalino y la permanencia en el nuevo estado (el estado no cataratoso es deseado como solución permanente y no de transición o de reversión al estado anterior) se investiga estudiando la estabilidad de las proteínas que la conforman.*

**Estabilidad intrínseca:** *La estabilidad de las proteínas se debe en primer lugar a una propiedad intrínseca de una cadena polipeptídica determinada. La energía de estabilización de las proteínas es una diferencia marginal entre cifras muy grandes, y es del orden de los 50 kJ/mol (12 kcal/mol aprox.) diez veces menor que la comparada con la suma total de las fuerzas atractivas (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, pares de iones, y fuerzas*

de Van der Waals) y repulsivas (energía de solvatación, efectos de volumen excluido, repulsión de cargas, entropía conformacional, etc.). Al calcular la energía por residuo aminoacídico se observa que es mucho menor que la energía térmica.

**Estabilidad extrínseca:** Existen varias formas de estabilización extrínseca de las proteínas (mediante formación de complejos con otras moléculas, tales como pequeños ligandos o macromoléculas; por medio de componentes solventes "compatibles"; etc)

**Cambios posttranslacionales:** También participan en la estabilización de las proteínas. Tenemos, en este caso, la formación de puentes disulfuros (S-S)<sup>1</sup>, la glicosilación, etc.

b) Estudio de la dispersión ultrasónica causada por la distribución de las opacificaciones en el cristalino.

Frente a un amplio espectro de distribuciones de opacificación la modelación teórica arroja el resultado, para efectos de dispersión, de que es más relevante el tamaño de la precipitación proteica en su interacción con la longitud de onda de la radiación ultrasónica, que la posición que dicha precipitación ocupa en cualquier plano de opacificación desde la parte anterior de la cápsula hasta el núcleo. La dispersión juega, en general, un papel absolutamente secundario en la reversión de la precipitación ya que al cambiar esta la longitud de onda de la radiación incidente y ser el fenómeno de carácter resonante la energía resultante se pierde en el medio básicamente en forma de calor.<sup>2</sup> Para el caso de opacificación nuclear severa el coeficiente de reflexión esperado tiene un valor normalizado cercano al valor uno, por lo tanto prácticamente toda la energía ultrasónica se devuelve hacia su lugar de incidencia.

c) Diseño del conjunto de transductores a ser construidos en la validación del modelo propuesto.

Los transductores ultrasónicos fueron diseñados en términos de las frecuencias optimizadas (rango de MHz) para modificar el índice de

<sup>1</sup> El puente disulfuro es el generador de la opacidad cristalina.

<sup>2</sup> Las cantidades de calor generado, dada la baja potencia de trabajo, son absolutamente despreciables como para ser consideradas en la modelación.

*refracción de los cristalinios cataratosos dentro de los niveles de potencia permisibles para trabajo oftalmológico (Específicamente para el cristalino este valor fluctúa de 0 a  $1.7W^{(1)}$  ).*

d) Estudio de la resonancia del sistema óptico a fin de determinar la(s) frecuencia(s) óptima en el proceso de reversión de las opacificaciones como agente causante de la opacidad.

*Se estudió la resonancia del sistema óptico, vale decir, la relación existente entre la amplitud de la velocidad y la frecuencia, obteniéndose las curvas de respuesta de la frecuencia para una estructura cristaliniana con un grado arbitrario de opacificación en términos de posición y profundidad dentro de la corteza. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de varias frecuencias resonantes de diversa amplitud, pero con una alta sensibilidad al tamaño de la precipitación, lo que atenta fuertemente contra la resonancia.*

e) Estudio de la eliminación de células epiteliales del cristalino mediante dispersión y aspiración.

*Los estudios realizados en este nivel confirman los trabajos de O. Nishi y K. Nishi en cuanto a estudios preliminares relativos a un método de eliminación de las células epiteliales del cristalino (CEC) en cirugía de la catarata combinando tratamientos farmacológicos y mecánicos. En estos primeros estudios se liberaron las células de sus complejos de unión mediante el uso de Dispase®, una preparación de proteasa neutra utilizada para separar células en los cultivos de tejidos. Para evitar lesiones de los tejidos intraoculares se disuelve la preparación enzimática en hialuronato sódico y se inyecta en el saco capsular el que se respeta cuidadosamente durante la cirugía endocapsular de la catarata. A continuación se aspiran las células mediante irrigación y aspiración. También puede utilizarse EDTA en vez de Dispase®.*

f) Estudio epidemiológico de los factores de riesgo en la catarata senil.

*En el transcurso de los dos últimos decenios, los estudios sobre la senescencia se han multiplicado, especialmente en Europa y Estados Unidos. Se ha*

---

<sup>1</sup> Este valor corresponde al deducido para la sección transversal del cristalino del valor de intensidad de 3.5 W/cm<sup>2</sup> que se encuentra en los trabajos especializados. (Ver, por ejemplo: "Física e Instrumentación Médicas de Juan Zaragoza, 2ª. Edición, 1992 pág. 543.)

advertido entonces que el envejecimiento nunca era la única causa de una "catarata senil" sino que debían contribuir otros factores de riesgo. Estudios epidemiológicos han permitido identificar un cierto número de estos factores. Así se han puesto de manifiesto que algunas cataratas van ligadas a un trastorno metabólico peculiar y reconocido (diabetes o tetania, por ejemplo), o incluso a ciertas afecciones dermatológicas como la eccema. Igualmente han permitido constatar que algunos medicamentos, como los tranquilizantes, los hipotensores, las hormonas esteroides, los diuréticos, deben ser considerados como un factor etiológico asociado cuando son utilizados en tratamiento prolongado; o incluso que algunas cataratas pueden desarrollarse por un traumatismo ocular (por ejemplo, fuerte contusión o herida penetrante) o en un entorno geográfico o profesional particular. En este caso, los factores de riesgo son los ultravioletas de gran altitud, los rayos ionizantes, los rayos infrarrojos o los productos químicos contaminantes. Se puede citar como ejemplo la "catarata de los vidrieros" que afecta a los obreros que trabajan con el fuego (vidrieros, fundidores) y que parece estrechamente ligada a la acción de los rayos infrarrojos.

Desde el punto de vista de nuestros estudios se debe señalar que después de analizarse diversas conformaciones de opacificación la estructura que estas presentan diversifica las frecuencias de trabajo ultrasónico siendo este un inconveniente de alto grado dado que un transductor es básicamente un equipo monofrecuencial que aunque permite el cambio de cabezal y, por lo tanto, el cambio de frecuencia, no tiene la capacidad de variación continua de esta. En resumen, el problema fundamental guarda relación con la mayor cantidad de frecuencias aceptables por la estructura de opacificación que el disponible técnicamente en base a la instrumentación disponible y diseñable.

g) Influencia de la arquitectura del cristalino en la transparencia de éste.

De hecho, la pérdida de transparencia es proyectada sobre todo por una fuerte difusión de la luz en el interior del cristalino, es decir, por una dispersión de los rayos luminosos una parte de los cuales ya no sigue su curso normal hacia la retina. Con una leve tasa de difusión, la imagen se deforma. Pero cuando la difusión es muy importante, el cristalino se vuelve opaco, a semejanza de un cristal esmerilado, por ejemplo. Cualquier defecto en la arquitectura del cristalino desempeñará el papel de centro de difusión. Los centros difusivos responsables de la pérdida de transparencia pueden estar repartidos en forma homogénea en todo el cristalino o, por el contrario, no tocar más que puntos muy precisos de éste.

*Pero antes de determinar cómo se formaban estos centros difusivos y, por vía de consecuencia, las opacificaciones, nuestro equipo ha aceptado los estudios acerca de como evoluciona el cristalino en los sujetos normales, es decir, que no presentan ni lesión ni catarata. Uno de los métodos utilizados pone en juego un fenómeno físico. En 1981, en el Instituto Clínico de Oftalmología Experimental de la Universidad de Bonn, diversos investigadores observaron el paso de un haz luminoso a través de numerosos cristalinos, gracias a un accesorio extremadamente resolutivo que utiliza la técnica fotográfica denominada de Scheimpflug.*

*Los trabajos de muchos investigadores y especialmente los de Peter Niesel de la Universidad de Berna, de N. Brown del Instituto oftalmológico de Londres y de Viorel Dragomiresu han permitido preparar un aparato fotográfico especial: el Topcon SL 45, lámpara de abertura rotativa. Este aparato permite registrar y observar sobre una placa fotográfica el comportamiento de un haz luminoso muy fino que atraviesa la parte anterior del ojo, es decir la córnea, la cámara anterior, que contiene el humor acuoso y el cristalino. Cuando el haz luminoso atraviesa el cristalino sobreviene una difusión de la luz. Esta difusión provoca un ennegrecimiento de la película fotográfica. Cuanto más ennegrecida está la película, más importante es la cantidad de luz difundida. La medida de este ennegrecimiento con ayuda de un microdensímetro da unas indicaciones sobre el poder difusivo del cristalino y, en consecuencia, sobre su transparencia o su opacidad. Comparando los densitogramas de sujetos normales de 30-40 años con los de sujetos de 50 - 60 años, nuestro equipo observó que la cantidad de luz difundida aumentó claramente en los sujetos de edad más avanzada. Tras haber examinado un total de 124 sujetos normales de 16 a 70 años de edad, pusimos de manifiesto un aumento de la difusión total de la luz por el cristalino con la edad, es decir una disminución de la transparencia. Gracias a este nuevo aparato fotográfico, se ha seguido el reparto espacial de los centros difusores; así parece claramente que el núcleo y la capa cortical anterior del cristalino son las zonas afectadas por el envejecimiento.*

h) Estudio del envejecimiento enzimático en las proteínas cristalinas.

*Frente al problema de cómo influye el envejecimiento en las proteínas cristalinas se suscita una pregunta:*

*¿Como envejecen las enzimas que intervienen en el metabolismo del cristalino, como por doquier en el organismo, y especialmente para proporcionarle la energía necesaria?*

*Este es el resultado de la degradación de los hidratos de carbono y particularmente de la glucosa: es la glucólisis. Como el cristalino no está vascularizado, los hidratos de carbono le son aportados por medio de humor acuoso. Cada enzima tiene una actividad específica. Para ser activo tiene necesidad de reconocer de un modo preciso su sustrato. Para tres enzimas necesarias en la glucólisis - la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la enolasa - se determinó que en el transcurso del envejecimiento había una disminución de afinidad de las enzimas para con su sustrato específico y que, por consiguiente, su actividad disminuía.*

*Al estudiar el núcleo del cristalino, hemos comprobado que posee una mayor diversidad de enzimas que las otras capas. Como no se producen nuevas síntesis de proteínas en el núcleo de cristalino, sólo una transformación molecular de las enzimas ya existentes pueden ser responsables de este fenómeno. Esto ha llevado a pensar que se forman unas variantes a partir de las moléculas enzimáticas activas y que estas variantes han perdido una parte de su eficacia. A semejanza de numerosos compuestos orgánicos, las enzimas pueden ser desnaturalizadas por el calor: es la labilidad térmica. Estudiando el núcleo del cristalino, a partir de 1979 se puso de manifiesto no sólo un aumento de la labilidad térmica de las enzimas, sino también unas variaciones de su tamaño y de su peso moleculares.*

*Numerosas observaciones permiten pensar que estas modificaciones de estructura acarrearán poco a poco una paralización del metabolismo, y más especialmente del metabolismo de los hidratos de carbono. Cuando éste cesa por completo en el cristalino, aparecen las opacidades. Así, al envejecer, las enzimas pierden su funcionalidad mientras que las proteínas cristalinas se oxidan y forman agregados.*

*Pero, la gran mayoría de personas de edad no presentan opacificación del cristalino. Estadísticas realizadas en las regiones del centro de Europa han revelado que aproximadamente el 80 % de las personas de edad avanzada (70-80 años) no presentan cataratas. ¿Por qué es así?*

*Además del agua y de las proteínas, un compuesto químico desempeña un papel esencial en el cristalino: es el glutatión, tripéptido constituido de tres aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico.*

Desde principios de siglo, muchos investigadores han observado que el contenido del cristalino en glutatión es excepcionalmente elevado. A la inversa, en la mayoría de cataratas, han observado una caída espectacular de su presencia. De ahí que hayan sido examinadas tres funciones esenciales de este tripéptido. En primer lugar, investigadores, del Massachusetts Institute of Technology en Estado Unidos, han demostrado que paralelamente a la aparición de proteínas de elevado peso molecular que difunden la luz se produce un descenso de la tasa de glutatión, el cual intervendría manteniendo los agrupamientos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas en su forma reducida, es decir, conservando su hidrógeno e impidiendo así la formación de puentes disulfuros (-SS) y de agregados de proteínas. Estos mismos agrupamientos sulfhidrillo participan en el control de transporte de los cationes (sodio, potasio, calcio...) Otros investigadores observaron en 1970 que cuando la tasa de glutatión disminuye, los agrupamientos SH se vuelven sensibles a la oxidación. De ello resulta una perturbación en la permeabilidad de las células a los diferentes cationes. Como ya hemos mencionado, este desequilibrio acarrea muy a menudo la formación de opacidades en el cristalino. Finalmente, y siempre gracias a su poder antioxidante, el glutatión protegería al cristalino de las lesiones llamadas oxidativas y especialmente de las que son provocadas por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), muy tóxico para las células. El peróxido de hidrógeno se encuentra en el humor acuoso del ojo en una gran número de especies animales. Puede ser el producto del metabolismo de muchos medicamentos o, más simplemente, sintetizado por la acción de la luz. Hoy muchos datos prueban que, en los cristalinos de cierta edad, el peróxido de hidrógeno deber ser considerado como uno de los factores responsables del desarrollo de las cataratas que afectan al núcleo del cristalino. Este punto específicamente se opone a nuestra visión del uso del ultrasonido como agente tratante de la opacidad dado que, en particular, para el tratamiento más severo de la enfermedad, por ejemplo, cataratas nucleares, al aumentar la potencia de trabajo podría entrarse en el régimen de cavitación ultrasónica con la generación de peróxido de hidrógeno y, por lo tanto, de oxidación del medio. Se ha puesto de manifiesto que el glutatión tiene la facultad de asegurar en poco tiempo la degradación de  $H_2O_2$  en un medio nutritivo. De ahí se infiere que desempeña un papel protector al evitar los daños producidos en el cristalino por las reacciones de oxidación. Más recientemente, se acaba de mostrar que en el tejido cristalino antiguo (es decir, en el núcleo donde el fenómeno es más visible), la capacidad de este sistema de protección está disminuida y el contenido de glutatión es más bajo, pero también que las actividades específicas de las enzimas asociadas al

*glutación son de menor importancia. Diríase que las enzimas de este sistema de protección contra la oxidación acabarán por ser ellas mismas víctimas de las alteraciones que tienen por misión prevenir. El «estrés oxidante» tendría, pues, unas consecuencias cada vez más graves conforme el sujeto envejece.*

i) Modificaciones biológicas de las propiedades del núcleo y del córtex del cristalino en la formación de opacidades.

*De acuerdo a estudios realizados por diversos investigadores europeos y los nuestros propios puede concluirse que la formación de opacidades en su amplia variedad no favorece la interacción con ondas ultrasónicas para todo el espectro de opacificación, sin embargo puede haber un uso limitado de este en el caso de algunos tipos de cataratas en conjunto con alguna técnica biológica de difusión de un aminoácido con propiedades antioxidantes.*

j) Estudio del comportamiento en base a difusión del aminoácido cisteína en su recorrido desde la parte anterior de la cápsula hasta el núcleo.

*El propósito de este estudio tiene relación con explorar las propiedades difusivas de la cisteína a fin de evaluar su capacidad como agente antioxidativo. El compuesto N-acetilcisteína (NAC) es un conocido derivado del aminoácido Cisteína. Ambos se caracterizan por presentar en sus estructuras el grupo sulfhidrilo (SH), lo que les otorga la propiedad reductora por lo que son ampliamente utilizados en el área farmacológica. Se ha descrito que la Cisteína dependiendo de la concentración utilizada puede actuar como oxidante de las proteínas de la membrana del eritrocito humano<sup>1</sup>. En un estudio comparativo con otros compuestos que presentan grupo SH en su estructura química, la NAC mostró una mayor eficacia en sus efectos antioxidantes. Dicho estudio fue realizado en eritrocitos humanos<sup>2</sup>*

*La Cisteína es un precursor de la molécula intracelular llamada glutación, quien está encargada, junto con otros compuestos, de mantener el medio celular protegido de los agentes oxidantes. Así, la NAC además de otorgar el substrato necesario para la síntesis de Glutación, por sí misma*

---

<sup>1</sup> V. Lips, G. Celedón, J. Escobar, E. A. Lissi (1996) Thiol-induced hemoglobin oxidation. Redox Report.

<sup>2</sup> V. Udipi, C. Rice Evans (1992) Thiol compounds as protective agents in erythrocytes under oxidative stress.

*puede recuperar a las proteínas que poseen grupos SH y los niveles de Glutación en aquellas células que han sido afectadas por agentes oxidantes<sup>3</sup>*

## METODOLOGIA

*Se utilizaron ojos de vacuno recién sacrificados, a los cuales se les extrajo cuidadosamente el cristalino. A estos cristalinos se les retiró la cápsula, la que fue sometida a un estudio de difusión de membrana, para comprobar la permeabilidad de esta al paso de NAC. Las soluciones utilizadas en este estudio de difusión fue solución de Krebs Fosfato (pH 7.4) con glucosa, con y sin NAC (1.0 mM)(2). La elección del medio a utilizar fue basada en la composición fisiológica del humor acuoso normal. La cápsula se deja en incubación por un período de 2 hrs., 2 hrs. 20 min., 2 hrs. 40 min., y 3 hrs. Posteriormente se analiza por método espectrofotométrico la presencia de NAC en la solución que inicialmente carece de ella. Esta determinación se realiza utilizando el reactivo de Ellman<sup>4</sup> para determinar la presencia de grupos SH, que en este caso solamente provendría de la NAC.*

*Los resultados obtenidos, aunque preliminares, sugieren fuertemente que debe continuarse con estos estudios por la enorme potencialidad asociada.*

---

<sup>3</sup> E. Rafeiro et al. Effects of N-acetylcysteine and dithiothreitol on glutathione and protein thiol replenishment during acetaminophen -induced toxicity in isolated mouse hepatocytes. Toxicology 93 (1994), 209-224.

<sup>4</sup> C.A. rice-Evans "Techniques in Free Radical Research" in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology" Vol. 22, pág. 227-231.

#### 4.-RESULTADOS.

**Dado que:**

- a) No puede asegurarse la estabilidad de la solución (la reversión del proceso de precipitación de proteínas tiene un carácter temporal).
- b) Existen frecuencias resonantes de diversa amplitud que sugieren que es posible atacar ultrasónicamente el medio opacificado, pero con una alta sensibilidad al tamaño de la precipitación lo que atenta contra la utilidad práctica de la resonancia.
- c) La acción del campo ultrasónico favorece, en grandes amplitudes, la formación de peróxido de hidrógeno lo que favorece el stress oxidativo del medio cristalino.
- d) El costo de inversión de los transductores es extremadamente alto (del orden de los doscientos mil dólares) y el uso es muy restringido como técnica de tratamiento de la enfermedad catarata (solo un tipo de catarata) dada la amplia variedad de configuraciones de opacificación que pueden darse con el consiguiente cambio de frecuencia ultrasónica requerido para tratar la opacificación.
- e) Los resultados en el campo del uso del aminoácido son bastante alentadores en su función reductora de opacificación cristalina.
- f) El ultrasonido aumenta la difusión del aminoácido a través de la cámara anterior del cristalino, lo que minimiza el tiempo de acceso a las regiones de opacificación nuclear.
- g) El método biológico es de bajo costo.
- h) Existen técnicas nucleares capaces de determinar de manera muy precisa la penetración que tiene el aminoácido a través de la cápsula, la corteza y el núcleo.

**Entonces se concluye que:**

- 1) Definitivamente no es viable la implementación ultrasónica para el tratamiento de la catarata.
- 2) Es altamente recomendable proseguir los estudios relacionados con el tratamiento bioquímico de la enfermedad catarata, dado que presenta todas las ventajas del tratamiento ultrasónico además de ser de bajo costo.
- 3) A la luz de los antecedentes investigados durante este proyecto se estima que el tratamiento bioquímico en combinación con el ultrasonido, (sólo para fines de aumentar la difusión del aminoácido), se constituye en una alternativa que debe seguirse hasta tener conclusiones mas definitivas.

#### **5.- IMPACTOS DEL PROYECTO.**

Es evidente que todos los impactos técnico-económicos ya mencionados en el "Resumen Ejecutivo" que eran atribuibles al tratamiento ultrasónico de la catarata son endosados a este nuevo tratamiento bioquímico. En base a los resultados obtenidos ULTRATECH S.A. desarrollará con costos propios los avances necesarios para enfrentar esta nueva fase bioquímica. En particular, ya se han hecho los contactos con el Centro Nuclear de La Reina a fin de marcar con tecnecio radioactivo el aminoácido a fin de pesquisar su grado de penetración dentro del cristalino y, por lo tanto, examinar de esta manera su eficiencia como agente reductor del stress oxidativo.

ESTRUCTURA DE COSTOS REALES  
PROYECTO TRATAMIENTO ULTRASONICO DE LA CATARATA

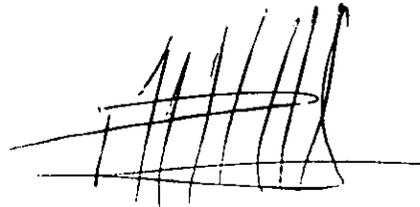
(Valores expresados en Miles \$)

PARTIDAS DE COSTO	COSTO TOTAL PROYECTO
Personal de Investigación	125.794
Personal de Apoyo	2.110
Servicios, Mat. y Otros	4.163
Usos de Bienes de Capital	3.600
Adquisición de Bienes de Capital	-
<b>TOTAL (Miles de \$)</b>	<b>135.667</b>

Declaro bajo juramento que los datos contenidos en este Resumen de Estructura de Costos del Proyecto son verídicos.



Representante Legal



Contador

## IMPLEMENTACION DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO.

Nombre Proyecto	TRATAMIENTO ULTRASONICO DE LA CATARATA.
Empresa	ULTRATECH S.A.

### IMPLEMENTACION DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

Los principales resultados obtenidos del desarrollo de este proyecto pueden reducirse a dos aspectos principales.

- 1) No resulta viable implementar técnica (ultrasonicamente) y económicamente (de alto costo) este proyecto.
- 2) Resulta ser de alto interés continuar con el enfoque bioquímico del problema, dado que se mantienen todas las ventajas iniciales con una agregación de una nueva ventaja: el bajo costo asociado. Dado que este nuevo enfoque se constituye realmente en **otro proyecto**, Ultratech S.A. costeará con recursos propios los gastos que se generen en esta nueva investigación para lo cual se han tomado los contactos necesarios con el Centro Nuclear de La Reina para usar tecnecio radioactivo para la marcación del aminoácido en su recorrido desde la cápsula hasta el núcleo del cristalino. Posteriormente se tomará contacto con laboratorios de análisis españoles con el fin de proceder a la marcación nuclear con neutrones del aminoácido de tal manera de asegurar que no cambia su estereoespecificidad (químicamente es el mismo elemento a través de su recorrido, lo que no está asegurado en el caso de usar como marcador del aminoácido tecnecio radioactivo).

## CARTA GANTT

Las actividades para este proyecto se encuentran discretizadas en los tres tramos siguientes:

ACTIVIDADES	CERO A CUATRO	MESES CINCO A DOCE	TRECE A DIECINUEVE
Estudio ctes. elásticas			
Est. fase sólido-líquido			
Det. morfolog. opacidad			
Bioquímica de proteínas			
Simul. interac. ultrasón.			
Est. dispers. por opacid.			
Est. resonan. sist. óptico			
Diseño computacional			
Est. envejec. enzimático			
Modific. biológ. núcleo			
Influenc. arquit. en trans			
Diseño de. actuadores			
Pruebas exper. sit. reales			
Ajuste final de diseño			
Enfoque bioquímico			

## BIBLIOGRAFIA

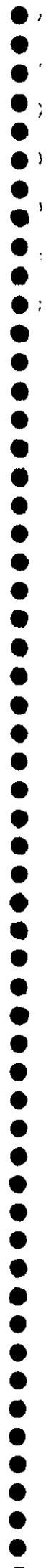
1. Crawford, A. E.: Ultrasonic Engineering, Butterworths, Londres, 1955
2. Hueter, T.F y Bolt, R. H.: Sonics, Wiley, Nueva York/Chapman y Hall, Londres 1955
3. Jarman, P.: J. acoust. Soc. Amer., 1960,32,1459
4. Brown, B y Goodman, J. E.: High Intensity Ultrasonics, Iliffe, Londres, 1965
5. Lang, R. L.: acoust. Soc. Amer., 1962, 34, 6
6. Newman , F. H y Searle V. H. L.: The general Properties of Matter, 5ª de., Arnold, Londres,1957
7. Hamilton, R.: Using Ultrasonics, expendido libre de gastos por la División de Información, D.S.I.R., State House, High Holborn Londres, W.C.I (sin fecha)
8. Jones, J. B y Powers , J. J.: WeldingJ., 1956, 35,761
9. Lindström, O y Lamm, O.: J. phys and colloid. Chem., 1951, 55, 1138
10. Wessler A.: J. acosut. Soc. Amer., 1953, 25, 761.
11. Mason, W. P.: Physical Acoustics- Principles and Methods, Vol. Ib, Academic Press, Nueva York, 1964
12. Gordon, D. (de): Ultrasonics as a Diagnostic and Sugical Tool, Livingstone, Edimburgo, 1964.
13. Carlin, B .: Ultrasonics, 2.a de., McGraw- Hill, Nueva York, 1960.
14. Crawford, A. E.: Ultrasonic Engineering, Butterworths, Londres, 1955
15. Glickstein, C.: Basic Ultrasonic, Rider, Nueva York/Chapman y Hall, Londres, 1960
16. Worlton, D.C.: Nondestr. Test., 1957, 15, 218
17. Hogarth, C. A. y Blitz, J. (eds):. Techniques of Non-Destructive Testing, Butterworths, Londres 1960.
18. Mason, W. P.: Physical Acoustics-Principles and Methods, Vol. Ia, Academic Press, Nueva York, 1964
19. Shahbender, R. A.: Trans. I.R.E., 1961, UE-8,19
20. Hueter, T. F y Bolt, R. H.: Sonics, Wiley, Nueva York/Chapman y Hall, Londres1955.
21. Smyth, C. N., Poynton, F. Y. y Sayers, J.F.: Proc. Inst. Elec. Engrs., 1963, 110, 16, y Smyth, C. N.: Ultrasonics, 1966, 4 , 15.
22. Bergmann, L.: Ultrasonics (trad, H.S. Hatfield), Wiley, Nueva York/Bell, Londres, 1938
23. Pacey, D.J.: Vacuum, 1959/60, 9, 261

24. Gordon, D. (de).: Ultrasound as a Diagnostic and Surgical Tool, Livingstone, Edimburgo, 1964.
- 25) Davson H.; Physiology of the Eye, Fourth Edition. Academic Press. New York and San Francisco, 1990.
- 26) Bonomi L. et al.: Bendazac lysine salt in treatment of cataract; a controlled study. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 33, 727-732, 1993.
- 27) Medline Database 1993.
- 28) Marner E. Rosenberg T.: Autosomal dominant congenital cataract morphology and genetic mapping. *Acta Ophthalmol* 67:151-158, 1989
- 29) Lambert S. R. et al. Ocular manifestations of the congenital varicella syndrome. *Arch Ophthalmol* 107:52-56, 1989
- 30) Liu I.Y. et al.: The association of age-related macular degeneration and lens opacities in the aged. *Am J Public Health* 79: 765-769, 1989
- 31) Deussen A, Pau H: Regional water content of clear and cataractous human lenses. *Ophthalmic Res* 21: 374-380, 1993
- 32) Unakar N, Tsui J.: Aldose reductase inhibitors and prevention of galactose cataracts in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1623-1632, 1990
- 33) Kuck, J.F.R., Jr. Biochemistry of the Eye. Academic London. 1990 pp 319-371.
- 34) Spector, A & Garner M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1274-1277.
- 35) H. Bloemendal (ed.) *Molecular and cellular biology of the eye lens*, Willey, New York, 1990.
- 36) H.M. Clayman, N.S. Jaffe, M.A. Galin, *Intraocular lens implantation, Techniques and complications*, Mosby Company Editor, 1990.
- 37) X. Bronner et al., *La correction de l'aphakie*, Rapport SFO, 1993.

38) Auguste R.C.: Protein and modification in cataract: possible oxidative mechanism. In: Mechanism Of Cataract Formation in the Human Lens, eds. Geoge Duncan, Academic Press London. 1993.

39) "Principles and Practice of Ophtalmology" (6 tomos) de Albert & Jacobiec,

40) "Retina" (tres tomos) del editor en jefe Stephen J. Ryan



## ANEXOS

## Oxidación y Catarata (The Ocular Lens)

Con el envejecimiento se produce un aumento constante de la fracción insoluble en agua de las proteínas del cristalino. Esto se debe, posiblemente, a cambios post-transcripcionales en dichas proteínas (racemización del ác. aspártico, etc.).

En cristalinos normales de pacientes ancianos se observan agregados proteicos unidos por fuerzas no covalentes, que producen una disminución de la transparencia del cristalino, principalmente a nivel del núcleo y sólo en zonas en relación a la membrana plasmática.

En cambio, en cristalinos con catarata avanzada se observan altos niveles de oxidación de aminoácidos, principalmente *metionina* (a metionina sulfóxido) y *cisteína* (a disulfidos, y, en menor cantidad, a ác. cisteico). Estos fenómenos de oxidación ocurren a nivel de mb. celular y también en el citoplasma.

En general, se piensa que los procesos oxidativos se inician a nivel de mb. cel. (cuyo espesor es de 10 nm aprox.), y que este estadio se define como fase precataratosa. Esta fase se caracteriza por la oxidación de las proteínas, lo que provoca un despliegue de sus estructuras, con la consiguiente exposición de sus grupos thiol -y también de otros susceptibles de oxidación-, su oxidación, y la formación de uniones disulfuro, que darán lugar a agregados proteicos de alto peso molecular (HMW). Estos HMW, debido a su tamaño, producen dispersión de la luz (500 nm, o más, de diámetro).

Por otro lado, los cambios post-transcripcionales que sufren las cristalinas llevan a la formación de nuevos componentes con estructuras abiertas, lo que permite la exposición y consiguiente oxidación de sus grupos thiol. Esto, más el deterioro de la actividad enzimática protectora del cristalino (glutatión), favorece la formación de los HMW.

### Características de los HMW

Presentan un polipéptido de 43 kD, que se ubica principalmente a nivel de mb. celular. Según estudios de identificación de dicho polipéptido, podría tratarse de una *γ* *cristalina* que, tras exponer sus grupos thiol y posterior oxidación, formaría uniones S-S intercatenarias. Este sería el núcleo de agregación de otros polipéptidos.

### Agudeza visual y dispersión de la luz

Se ha observado que el ojo tolera un gran incremento de la dispersión de la luz sin cambios significativos de la agudeza visual.

### Origen de los agentes oxidantes

La mayoría de los agentes oxidativos provienen desde el exterior del cristalino (humor acuoso). Dentro de los agentes oxidantes tenemos: *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* (principal); *tensión de O<sub>2</sub>* aumentada, que produce superóxidos; *ác. ascórbico*, que se encuentra en el humor acuoso en altas concentraciones, y que, en presencia de luz y riboflavina, favorece la formación de *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. Además, una serie de reacciones fotoquímicas pueden producir cambios oxidativos en el cristalino.

### Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se ha constatado que los pacientes cataratosos presentan altas concentraciones de *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* en el h. acuoso. Además, experimentalmente se ha inducido opacificación en cristalinos sometidos a altas concentraciones de *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*.

El *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* altera la bomba Na-K y la permeabilidad de la mb. celular, lo que lleva a un desbalance iónico y metabólico que deriva en una alteración de la hidratación de las cristalinas. Añadido a esto se presenta una disminución de los sistemas enzimáticos defensivos, lo que en definitiva lleva a la formación de los HMW y la ruptura de la mb. celular. Todo esto en conjunto produce opacificación del cristalino.

El *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* también estimula al shunt hexosa monofosfato, y, por lo tanto, la formación de NADPH.

### Conclusión

En general , los agentes iniciadores de la catarata provienen del exterior del cristalino (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glucosa, etc.).

Es probable que los fenómenos de oxidación estén presentes en la mayoría de los procesos cataratosos.

### Nota

En la catarata se observa: disminución de glutatión reducido, disminución de ATP, cambios en la concentración de iones Na y K, aumento de H<sub>2</sub>O, aumento de Ca, ruptura de mb. celular, y pérdida de proteínas (en algunos casos).

## Bases físicas de la transparencia del cristalino (The Ocular Lens)

El cristalino cataratoso se caracteriza por presentar un aumento de la dispersión de la luz, lo que, a su vez, produce una sensación de brillo al paciente (al inicio), y/o pérdida de la agudeza visual. La dispersión de la luz en la catarata no es del tipo Rayleigh, es decir, no depende de la  $\lambda$  de la luz. Por lo tanto, las partículas dispersantes deben estar en el rango de tamaño de  $\lambda/20$  o más. El brillo que se produce en la catarata es mayor en el caso de las opacidades ubicadas en la región posterior, porque allí se produce una redispersión de lo enfocado por la córnea y las zonas anteriores del cristalino.

### Mecanismos de formación de la catarata

Existen 5 mecanismos que participan en el proceso cataratoso, que pueden actuar individualmente o en conjunto.

**Agregación:** las proteínas y macromoléculas del citoplasma del cristalino están altamente hidratadas. Además, están en constante movimiento térmico. El nº de colisiones efectivas entre estas moléculas depende de la viscosidad del medio, de las capas de hidratación, y de las cargas de la superficie de las proteínas. Cualquier cambio en lo anterior llevará a un mayor contacto de las moléculas, y, por lo tanto, a agregación.

Los agregados deben alcanzar tamaños del orden de  $\lambda/20$  o más para producir dispersión de la luz, lo que equivale aprox. a un peso molecular de  $10^6$  d., tamaños que se encuentran principalmente en el núcleo.

Las proteínas de alto peso molecular solubles (HMW solubles) serían las precursoras de los agregados proteicos insolubles. El tamaño de estas partículas es de 500 nm o más (según microscopía electrónica).

Los agregados se originan de una variedad de cambios en las estructuras 2ª y 3ª de las proteínas. En esto participan los enlaces S-S, los puentes de  $Ca^{+2}$ , y uniones covalentes no S-S (por fenómenos de transaminación).

Según estudios teóricos los agregados HMW con peso molecular de  $50 \cdot 10^6$  d serían capaces de dispersar luz y provocar catarata.

En *cristalinos normales* el envejecimiento produce disminución de su transparencia debido a un aumento de los agregados proteicos unidos por fuerzas *no covalentes*. Esto ocurre principalmente a nivel del núcleo. En cambio, en *cristalinos cataratosos* se producen uniones covalentes en los HMW, principalmente del tipo S-S, aunque también se observan otras uniones covalentes. Estos fenómenos no ocurren solamente en el núcleo.

El proceso de formación de los agregados se inicia por la ocurrencia de fenómenos oxidativos, en los que participa fundamentalmente el  $H_2O_2$ , que proviene, junto con otros agentes oxidativos, desde el exterior del cristalino. Es posible que 1 o más de los grupos de aminoácidos accesibles a la oxidación se oxiden, lo que producirá una consiguiente alteración de la estructura de las proteínas (despliegue), facilitándose la formación de enlaces S-S, y, por lo tanto, la formación de agregados.

Los fenómenos oxidativos no sólo involucran a las proteínas del citoplasma, sino que también a la mb. celular.

La concentración normal de  $H_2O_2$  en el h. acuoso es de 26  $\mu$ molar. Y en la catarata es de 600  $\mu$ molar.

En estadios precataratosos de opacificación se producen sutiles cambios moleculares debidos a interacciones débiles (no covalentes), por lo tanto, la prevención de la catarata es un problema biofísico.

La transparencia normal del cristalino puede mantenerse si las dimensiones de los elementos dispersantes no aumentan.

**Sinéresis:** consiste en un aumento en la amplitud de las fluctuaciones, es decir, un aumento de la diferencia de los índices de refracción entre las unidades dispersantes y el medio.

El proceso de sinéresis es independiente del de la agregación, pero ambos pueden ocurrir simultáneamente.

El mecanismo de sinéresis se produce por un colapso de la red de proteínas de las células fibrilares del cristalino, es decir, se produce una pérdida del H<sub>2</sub>O de hidratación proteica y un aumento del H<sub>2</sub>O libre en las céls. fibrilares.

El H<sub>2</sub>O de hidratación tiene una estructura similar al hielo.

Del total de H<sub>2</sub>O en el cristalino tenemos: 10% extracelular

90% intracelular: 36% libre  
54% unido:

3-4% altamente

unido; no intercambiable. El resto es intercambiable con el H<sub>2</sub>O libre.

Según estudios, el H<sub>2</sub>O de hidratación (unida) convertida a H<sub>2</sub>O libre en el proceso cataratoso puede ser de alrededor de 1/3 del H<sub>2</sub>O intracelular. Como la energía de los enlaces de H es de 3 kcal/mol, entonces el proceso de sinéresis requiere como mínimo 33 cal/gr de tej. cristalino, es decir, es un proceso endérgico (endotérmico).

Los procesos de deshidratación pueden producir catarata a través de flujos de H<sub>2</sub>O de los espacios ya mencionados. Por ejemplo, la deshidratación de la córnea provoca pérdida del H<sub>2</sub>O extracelular del cristalino, lo que determina un flujo del H<sub>2</sub>O intracelular (libre) del cristalino, que, a su vez, lleva a la deshidratación de la red proteica.

El envejecimiento de cristalinos normales lleva a una pérdida de la transparencia de los mismos, debido fundamentalmente al mecanismo de sinéresis.

En la catarata nuclear se calcula que aprox. 42% de las opacidades se debe a sinéresis, y que sólo un 14% a agregación.

La morfología de la catarata también debe ser considerada. La catarata nuclear con centro denso se correlaciona en un 99,6% con sinéresis. En cambio la catarata nuclear con forma de anillo se correlaciona mejor con fenómenos de degradación de mb. y procesos de desarreglo del citoesqueleto.

La catarata cortical se correlaciona bien con fenómenos de sinéresis. Lo mismo para el caso de la catarata diabética (el aumento de los polioles produce una disminución de la hidratación proteica).

#### Factores que contribuyen a la sinéresis

Cambios en la estructura 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, y otras, lleva a una deshidratación proteica y a un secuestro de agua hacia otros medios. Los cambios en la estructura 1<sup>a</sup> pueden deberse a deamidación de glutamina (propio del envejecimiento). Los cambios en las estructuras 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> pueden producirse por agregación, debido principalmente a interacciones intramoleculares, puentes S-S, transaminación, y racemización.

Sinéresis afecta al cristalino completo puesto que la migración de agua afecta a todo el cristalino.

**Separación de fase:** en este caso se produce opacidad debido a agregación de proteínas, que forman microfases de un tamaño comparable a la  $\lambda$  de la luz.

Es un fenómeno reversible (ocurre en condiciones de equilibrio), y se ve en la catarata por frío.

Por el contrario, en la sinéresis y en la agregación el fenómeno es irreversible.

**Degeneración de Mb. celular:** la ruptura de la mb., debido a su degradación, produce una alteración del ordenamiento intracelular, es decir, a un aumento de las fluctuaciones aleatorias (o disminución de las fluctuaciones ordenadas), lo que se refleja por una disminución de las interferencias destructivas, que, a su vez, se manifiesta por turbiedad.

**Desorientación citoesqueleto:** los elementos del citoesqueleto participan en las propiedades viscoelásticas del cristalino, que son importantes en los fenómenos de acomodación. Además, proveen de anisotropía óptica (orientación de las fluctuaciones) al cristalino, lo que permite su birrefringencia intrínseca. La importancia de la anisotropía óptica es mayor para el caso de luz polarizada.

El citoesqueleto contribuye a la transparencia del cristalino mediante la birrefringencia de compensación positiva, que se opone a la negativa debida a la membranas celulares. De esta manera se produce una disminución de la birrefringencia total. Por lo tanto, una alteración del orden del citoesqueleto, o una alteración de las membranas, producirá variaciones de la birrefringencia total, lo que se manifestará por una mayor turbiedad. Pequeñas alteraciones de las membranas influyen poco en la birrefringencia total, pero pequeños desarreglos del citoesqueleto tienen un efecto importante en dicha birrefringencia.

La densidad de las fluctuaciones (debida a la concentración proteica) y la orientación de las fluctuaciones de las macromoléculas del cristalino participan en la transparencia del cristalino.

**Cambios en el cristalino responsables del aumento de dispersión de la luz en algunos tipos de catarata senil** (Ocular Lens)

El aumento de la dispersión de la luz se debe a las variaciones de los índices de refracción dentro del cristalino. Los cambios locales en la distribución del material orgánico (principalmente proteínas) dentro del cristalino son la mayor causa de fluctuaciones del índice de refracción en la catarata temprana.

Tipos de catarata senil: subcapsular cortical  
supranuclear cortical  
nuclear

**Catarata cortical:** existe un aumento de los espacios intercelulares, y un aumento de la formación de grandes interfases irregulares en la distribución de las proteínas.

**Catarata nuclear:** existe un aumento de los agregados proteicos en la zona central del cristalino. No se observa un aumento de los espacios intercelulares. Los agregados miden entre 50 y 100 nm de diámetro. El tamaño de las  $\alpha$  cristalinas es de 14 nm de diámetros aproximadamente.

### Metabolismo del cristalino ( Jakobiec)

Principalmente glicólisis anaeróbica. También participa el shunt hexosa monofosfato y la vía de la aldosa reductasa.

En el interior del cristalino se observa alguna actividad enzimática, pero la mayoría de los multisistemas enzimáticos están ausentes o presentan niveles de actividad disminuida.

### Transparencia del cristalino ( Jakobiec)

Para mantener la transparencia del cristalino, las fluctuaciones espaciales del citoplasma de sus células fibrilares deben ser pequeñas en comparación a la longitud de onda de la luz, lo que se traduce en una menor dispersión de luz.

El tamaño de las fluctuaciones espaciales depende de:

- tamaño molecular (peso molecular) de las proteínas;
- concentración proteínas;
- fracción del volumen proteico;
- organización de las proteínas en el citoplasma (interacciones).

Todo esto depende, a su vez, de la hidratación del citoplasma y de las fuerzas iónicas.

Las fluctuaciones espaciales microscópicas en el citoplasma se corresponde con las fluctuaciones microscópicas de los índices de refracción.

Las opacidades se deben a un aumento de las discontinuidades de densidad del citoplasma (microscopía). Pequeños cambios en las fluctuaciones espaciales producen opacidad, lo que , a su vez, lleva a una disminución de la AV.

Los componentes sinusoidales de las fluctuaciones espaciales son los llamados componentes de Fourier, los que al ser mayores que  $\frac{1}{2}$  de la long. onda de la luz (200 nm), provocan disminución de la transparencia y aumento de la dispersión.

**Bases moleculares de la transparencia del cristalino**  
(J.Mol.Biol. 205:713-28;1989)

Entre las cristalinas, la más eficiente para dispersar luz es la  $\alpha$  cristalina (la más grande).  $\alpha$  cristalina está formada por 4 subunidades, que se agregan en diversa cantidad. Es una partícula globular (polímero).

Para que el cristalino tenga una transparencia adecuada es importante que su absorción de la luz sea baja (pocos cromóforos), y lo mismo para su dispersión (fluctuaciones de rango estrecho de los índices de refracción).

A altas concentraciones de proteínas, como es el caso de las cél. fibrilares (sobre  $400 \text{ mg/cm}^3$ ), el nivel de dispersión está determinado principalmente por la organización espacial de las cristalinas.

Se postula un modelo para la  $\alpha$  cristalina, que consiste en una estructura cuaternaria de 3 capas concéntricas, y con forma tetrahédrica simétrica. Su diámetro sería de  $100 \text{ \AA}$ .

**Patrones de distribución de las proteínas en capas concéntricas en cristalinos de bovinos: cambios con el desarrollo y el envejecimiento**

(CER Vol. 7 n° 1; 1988)

El 50% de las proteínas totales del cristalino son  $\alpha$  cristalinas.

Al pasar el tiempo las  $\alpha$  cristalinas son menos solubles.

En la vejez también se observan HMW $\beta$ .

Las capas centrales del cristalino presentan proteínas HMW. En cambio las capas periféricas presentan proteínas de bajo PM.

**Proteínas HMW**

Consisten principalmente de  $\alpha$  cristalinas, pero también presentan  $\beta$  cristalinas. Se observan en personas ancianas.

La proporción  $\alpha A:\alpha B$  es de 3:1 en todas las regiones del cristalino.

En el núcleo disminuye el % de  $\alpha$  cristalinas solubles, y aumenta el % de proteínas insolubles.

**Proteínas MMW**

Están formadas principalmente por  $\beta$  cristalinas.

**Proteínas LMW**

Representan hasta un 22% de las proteínas en el centro del cristalino. Esta cantidad disminuye con la edad.

Están formadas principalmente por  $\gamma$  cristalinas.

**Proteínas Insolubles**

Constituyen un 10% del total de las proteínas en las capas más externas. Este valor aumenta hacia el centro, alcanzando un 85% en los cristalinos de ancianos.

Los polipéptidos que las conforman pertenecen a  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  cristalinas, pero principalmente polipéptidos  $\alpha$ . Por lo tanto, las  $\alpha$  cristalinas serían el principal constituyente de las prot. insolubles, lo que concuerda con la disminución de las  $\alpha$  cristalinas solubles en el centro del cristalino.

**Desarrollo y envejecimiento**

Las  $\alpha$  cristalinas son las proteínas más susceptibles a sufrir cambios con la edad, de solubles pasan a insolubles en el centro del cristalino.

Las cristalinas que primero se producen son las  $\gamma$ , luego disminuye su síntesis hasta que en la vejez se reduce a cero (en las capas externas).

Las  $\alpha$  crist. representan el 50% del total sintetizado a toda edad.

Las prot. insol. aumentan con la edad. El proceso de insolubilización se debe a cambios posttranslacionales y de deamidación, los que favorecen la polimerización. También participa la

disminución de agua del núcleo del cristalino. Estos procesos afectan principalmente a las  $\alpha$  cristalinas, pero también, en menor proporción, a las  $\beta$  cristalinas.

### Proteínas estructurales del cristalino (Exp. Eye Res.)

#### $\gamma$ cristalinas

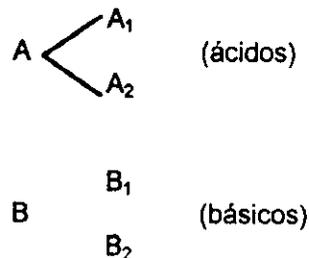
Representan el 20% del total de las prot. solubles del cristalino. Son monómeros.  
Están presentes en el núcleo.  
Presentan un alto contenido de tioles.

#### $\beta$ cristalinas

Son similares estructuralmente a las  $\gamma$  cristalinas.  
Son polímeros. Presentan diversos tamaños ( $\beta_H$ , de alto PM; y  $\beta_L$ , de bajo PM).  
Sus tamaños son menores que los de las  $\alpha$  cristalinas.  $\beta_H=150 \text{ A}^\circ$  y  $\beta_L=50 \text{ A}^\circ$ .

#### $\alpha$ cristalinas

Son las de mayor PM, cuyo rango va de  $4 \cdot 10^5$  a  $1,2 \cdot 10^6$ .  
Son polímeros. Presentan 4 subunidades:



Sólo la subunidades A presentan grupos tioles.

$A_1$  es más ácido que  $A_2$ . Estructuralmente  $A_1$  y  $A_2$  son casi idénticos.

$A_2$  puede convertirse en  $A_1$  perdiendo 2 grupo amida.

$B_2$  derivaría de  $B_1$ . Estas conversiones son lentas (de meses a años).

En las capas externas del cristalino se encuentran  $\alpha$  cristalinas de menor PM.

En las capas internas son de mayor PM.

#### Proteínas insolubles

Se encuentran en cristalinos normales y en cataratosos.

Derivan de una mezcla de cristalinas.

Se observan más en el núcleo.

HMW

Habría 4 tipos de HMW:

- HMW de agregados de  $\alpha$  cristalinas
- HMW de fracciones de proteínas solubles
- HMW con puentes S-S
- HMW covalentes no S-S de la catarata brunesciente

*HMW de agregados de  $\alpha$  cristalinas:* estos agregados de  $\alpha$  cristalinas presentan glucosa unida no covalentemente. El  $\text{Ca}^{+2}$  participaría también en la formación de estos agregados. (Esto no ocurre para  $\gamma$  cristalinas, y poco para  $\beta$  cristalinas)

Este tipo de  $\alpha$  cristalinas aumenta con la edad. Sus PM son, en el mayor números de los casos, menores que  $5 \cdot 10^5$  D.

*HMW de fracciones de proteínas solubles:* derivan de mezclas de cristalinas solubles. Se han aislado de cristalinos normales y cataratosos. Su PM es mayor o igual que  $10^6$  D, con tamaños mayores que 500 nm (por microscopía electrónica).

La proporción de estas proteínas aumenta con la edad. Se encuentran mayormente en cristalinos cataratosos, y en el núcleo.

Su composición de aminoácidos no coincide con ninguna otra cristalina.

Estas proteínas, al aislarlas del córtex, presentan 9 polipéptidos de  $11 \cdot 10^3$  hasta  $5 \cdot 10^4$  D., que estarían formados por polipéptidos de todas las cristalinas.

El  $\text{Ca}^{+2}$  está presente y participa en la formación de estos agregados.

Estas proteínas dispersan la luz.

*HMW con puentes S-S:* están presentes principalmente en el núcleo de los cristalinos cataratosos.

*HMW con puentes covalentes no S-S:* se aprecian principalmente en las cataratas brunescientes, y sobretodo en el núcleo.

Pertenecerían a un estadio posterior a la formación de las HMW S-S de la catarata nuclear.

Probablemente las fracciones insolubles y las HMW tienen orígenes comunes.

### **Sonicación sobre $\alpha$ cristalinas: sus efectos**

(C.E.R. Vol. 10, nº 2; 1989)

La sonicación sobre  $\alpha$  cristalinas bovinas produjo un aumento de su PM (de 770 kDa a 2300 kDa)  
La sonicación alteraría la configuración de las subunidades de la superficie (o sus cercanías) de la proteína. Estos cambios estructurales llevan a la formación de agregados proteicos.

#### **Método**

La sonicación se llevó a cabo con 30 W de potencia con un MSE Soniprep 150 de 23 kHz. La aplicación fue de 21 ciclos, donde cada uno era de 30 seg., y luego 60 seg. de enfriamiento. La solución de proteínas fue de 5 ml de 1 mg/ml.

Los ciclos descritos permitieron minimizar los grandes aumentos de temperatura.

#### **Resultados**

La sonicación habría provocado un reordenamiento de la molécula -y no un polímero mayor por agregación con otras  $\alpha$  cristalinas- lo que llevó a la formación de agregados mayores y más estables.

La sonicación aumentaría la hidrofobicidad de la superficie de la proteína, sin embargo, la polimerización conlleva una disminución de las superficies hidrofóbicas.

La distancia entre los residuos de Cys. es de 5 nm aproximadamente.

La sonicación provocaría fusión de las  $\alpha$  cristalinas, formándose una molécula mayor. Pero también existe la posibilidad que la sonicación disocie a las proteínas, cuyas subunidades se reensamblarían espontáneamente formando agregados. El tamaño de los agregados dependerá del medio en que se encuentren ( $T^\circ$ , Ph, etc). Por ejemplo, se ha observado que a mayor  $T^\circ$  se producen más agregados.

## Variaciones estructurales de las cristalinas

(TIBS Julio 1985)

El cristalino refracta luz porque contiene una alta concentración de proteínas. Y es transparente porque sus proteínas contienen pequeñas cantidades de cromóforos visibles, y están estrechamente agrupadas, de tal modo que no se producen discontinuidades abruptas de los índices de refracción.

### Interacciones de las subunidades

El destino inmediato de las subunidades es el plegamiento, y reconocimiento de sus respectivos miembros de familia, para formar plímeros de diverso tamaño y carga. Estos polímeros están intercalados con monómeros de  $\gamma$  cristalinas.

A Ph fisiológico tenemos que:

- las  $\alpha$  cristalinas presentan muchas cargas (-).
- las  $\beta$  cristalinas presentan un amplio rango de cargas.
- las  $\gamma$  cristalinas se presentan levemente (+).

Las subunidades A y B de las  $\alpha$  cristalinas están en una proporción de 3:1.

La  $\alpha$  cristalina nativa presenta un diámetro aproximado de 140 Å<sup>o</sup> (por electromicroscopía).

Se propone un modelo de la estructura de las  $\alpha$  cristalinas, en que se plantea una estructura 4<sup>a</sup>, donde las subunidades A están preferentemente en el interior, y las B en el exterior.

Las subunidades de las  $\alpha$  cristalinas interactúan de modo tal que pequeñas perturbaciones provoca ordenamientos alternativos, que pueden llevar a la formación de agregados polidispersos de  $\alpha$  cristalinas.

### Cambios con la edad

Las interacciones proteicas dentro de las células del cristalino cambian con la maduración y la edad.

Se produce un aumento en la formación de agregados de  $\alpha$  cristalinas, y también de  $\beta$  cristalinas.

En la catarata nuclear las cristalinas se oxidan invariablemente, y se forman interacciones que llevan a una incompatibilidad con la transparencia del cristalino.

También se produce un aumento de los procesos de agregación, y una concomitante deshidratación, lo que lleva a un aumento del índice de refracción. El aumento del índice de refracción, más la deshidratación (rigidez), provocan una pérdida de la capacidad de acomodación del cristalino (presbicia).

### **Stress Fotooxidativo** (Jakobiec, Cap. 40)

La función principal de la córnea y el cristalino es enfocar la luz sobre la retina. Pero, además, actúan como filtro de la radiación UV ( $\lambda$  UVB=290-320 nm;  $\lambda$  UVA=320-400 nm).

La córnea absorbe las  $\lambda$  menores que 295 nm. Las mayores alcanzan al cristalino, el que absorbe las  $\lambda$  entre 295-400 nm. Por lo tanto, a la retina llegarán las  $\lambda$  mayores que 400 nm.

No se observa un fotodaño sustancial a nivel de la córnea y el humor acuoso.

Sin embargo, el cristalino (que absorbe  $\lambda$  entre 295-400 nm) puede sufrir fotodaño de sus proteínas estructurales, del ADN de las cél. epiteliales, y fotoinactivación de sus enzimas. Estos daños son acumulativos debido al nulo recambio de las proteínas dañadas por parte del cristalino. Esta es una de las causas de la formación de catarata, especialmente para el caso de radiación UVB.

#### **Definición de stress fotooxidativo**

Resulta principalmente por la absorción de luz por parte de los constituyentes del cristalino (prot. estructurales, enzimas, ADN), lo que lleva a una alteración de sus funciones.

En cristalinios jóvenes los cromóforos absorbentes de luz son: los residuos de Trp de las cristalinas; el 3HKG (3-hidroxikynurenina glucósido), un metabolito del Trp; el ADN de las células epiteliales; y/o cromóforos exógenos que producen reacciones de fotooxidación sensibilizadas (el 8-metoxipsoraleno, por ejemplo).

Entre los aa. de las cristalinas tenemos que el Trp absorbe el 95% de la absorción total del cristalino. El 5% restante es absorbido por otros aa. aromáticos (Tyr, Phe, Cys).

Con la edad el cristalino toma un color amarillento, que produce un aumento de la absorción de UVA y luz visible, lo que conlleva a una mayor fotooxidación.

Con  $\lambda=350$  nm tenemos que:

- a los 40 años un 98.5% de la luz incidente es absorbida.
- a los 80 años un 99.9% de la luz incidente es absorbida.

Los principales factores que participan en las alteraciones fotoinducidas en el cristalino son:

- las long. de onda transmitidas por la córnea (295-400 nm, en cristalinios jóvenes).
- la concentración de  $O_2$  en el humor acuoso.
- la disminución de los inhibidores de las reacciones fotoquímicas.
- los principales sitios de daño fotooxidativo.

La  $p^o$  de  $O_2$  disminuye dentro del cristalino, y es un 20% de la  $p^o$  de  $O_2$  de la sangre aproximadamente. El aumento de  $O_2$  produce un aumento de las reacciones fotoquímicas especialmente aquellas involucradas en procesos de fotosensibilización en presencia de  $O_2$ , lo que lleva a la formación de especies de oxígeno reactivo ( $O$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ).

Se piensa que la catarata aparece por una disminución de la defensa antioxidativa del cristalino. En esto participan antioxidantes enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), y no enzimáticos (ác. ascórbico, que está en el h. acuoso y en las céls. fibrilares; vitamina E, un radical libre captador de  $O$ , que está presente en la mb. del cristalino; GSH, que permite eliminar radicales libres y proteger a las cristalinas de fotopolimerizaciones).

Los principales sitios de daño fotoquímico en el cristalino son: céls. epiteliales, cristalinas, y mb. de las céls. fibrilares.

El fotodaño a nivel del ADN de las céls. epiteliales puede llevar a la muerte celular, a síntesis anormal de proteínas, y/o a patrones alterados de diferenciación celular.

El daño a nivel de la mb. celular provoca peroxidación de lípidos, fotopolimerización de proteínas intrínsecas, y/o alteración de los sist. de transporte.

El daño a nivel de las cristalinas lleva a la formación uniones intercatenarias, agregación, y cambios conformacionales.

A nivel enzimático se produce inactivación de las enzimas, con la consiguiente pérdida de protección antioxidante.

Todo lo anterior participa en los procesos de opacificación y catarata.

### **Acción fotodinámica**

Es el efecto dañino de la luz,  $O_2$ , y componentes sensibilizados (fotosensibilización). Se requiere la presencia de todos estos.

Se distingue del daño fotoinducido (radiación UV, por ejemplo) porque en este caso se daña al ADN y no se requiere de  $O_2$ .

Uno de los fotosensibilizadores más importantes es un fotoproducto del Trp ante la acción de UVB y UVA: el NFK (N-Formilkinurenina).

### **Espectro de acción**

Es la medición del efecto biológico de la luz en función de la long. de onda. La magnitud del efecto biológico se relaciona con el número de fotones absorbidos por el cromóforo que inicia el efecto fotobiológico. El espectro de acción corresponde al espectro de absorción del cromóforo.

El espectro de acción con máximo efecto para la opacificación del cristalino está alrededor de los 300 nm.

### **Dosis Ocular**

La cantidad de radiación UVB del sol que alcanza a la superficie de la Tierra es de 2 W/sq aproximadamente. La dosis ocular de radiación UVB incidente sobre la córnea es de alrededor de un 20% de la radiación UVB solar.

La absorción UVA del cristalino aumenta con la edad. Pero el orden de magnitud de radiación UVA que produce catarata es mayor que para UVB.

### **Mecanismos fotoquímicos**

La absorción de la luz por una molécula es esencial para la producción de una reacción fotoquímica. Si el cromóforo cambia químicamente durante la reacción se habla de *reacción fotoquímica directa*. Cuando el cromóforo no cambia químicamente pero provoca un cambio químico en otra molécula se habla de *reacción fotosensibilizada*.

La absorción de un fotón produce un cambio de estado electrónico en el cromóforo, el cual vuelve a su estado original de reposo liberando el exceso de energía en forma de luz o calor, transfiriéndola a otra molécula a través de un cambio químico, o mediante una reacción con otra molécula, formando un fotoproducto.

La absorción de energía excita a un electrón a un nivel de energía mayor (cambio de orbital) con o sin cambio de spin. Si no hay cambio de spin se habla de estado excitado único, pero si se produce un cambio de spin se habla de estado excitado triple.

La mayoría de las reacciones de oxidación por fotosensibilización ocurre vía estado triple de los cromóforos.

Los cromóforos endógenos del cristalino (NFK, ác. kinurenico (KUA), y riboflavina) tiene una buena eficiencia fotosensibilizadora. Muchas tinciones (azul de metileno, rosa bengala) y pigmentos (flavinas, hematoporfirinas) son buenos fotosensibilizadores. Además, estos componentes absorben luz visible, UVA, y UVB.

### Oxidaciones por fotosensibilización

Para los sistemas biológicos expuestos a la luz, se pueden producir 2 tipos de mecanismos de fotooxidación, por medio del cual un sensibilizador en estado triplete reacciona posteriormente: reacción tipo I ; y reacción tipo II.

Reacción tipo I: el sensibilizador en estado triplete reacciona con un sustrato reducido (aminoácidos de una proteína o de componentes de membrana) quitándole un protón, o transfiriéndole un electrón.

El radical libre resultante o radical anión puede experimentar una variedad de reacciones, incluyendo la reducción univalente del  $O_2$  a anión superóxido ( $O_2^-$ ). El anión superóxido tiene muchas vías potenciales de reacción: puede sufrir una reacción de dismutación y generar  $H_2O_2$  ; además, la interacción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  puede llevar a la formación de radicales hidroxilo.

Reacción tipo II: la molécula sensibilizadora en su estado triplete interactúa directamente con el estado basal del  $O_2$  transfiriéndole energía y formando oxígeno single  $^1O_2$  . Este puede reaccionar posteriormente con varias moléculas en un sistema biológico.

Menos eficientemente la molécula sensibilizadora puede transferir electrones al  $O_2$  y formar  $O_2^-$  , y una forma oxidada del sensibilizador.

El tipo de mecanismo que se siga dependerá de varios factores: accesibilidad del sustrato al sensibilizador en estado triplete; polaridad del medio;  $\lambda$  de la irradiación; concentración de  $O_2$  ; y las tasas invariables de los diferentes productos de formación.

Las oxidaciones por fotosensibilización son importantes en el cristalino porque una vez que se generan estas especies difusivas de oxígeno reactivo, pueden potencialmente oxidar a otras moléculas del cristalino.

Los aminoácidos que se alteran por oxidaciones de fotosensibilización son Trp, His, Cis, Met, y Tyr. Existen varios productos derivados de la oxidación del Trp (NFK, por ejemplo).

La fotooxidación de la His produce ruptura del anillo imidazol, lo que lleva a la formación de ác. aspártico después de una hidrólisis ácida.

La Met es oxidada a sulfóxido de Met.

La Cis es oxidada a cistina y a ác. cisteico.

Los fotoproductos de la Tyr no se conocen, pero la fotooxidación involucra una inicial extracción del protón fenólico.

Las tasas de oxidación de los aminoácidos de las proteínas depende de su accesibilidad al fotosensibilizador.

La conformación de las cristalinas hace que algunos Cis y Trp sean más susceptibles a oxidarse que otros.

El resultado final de las reacciones de oxidación fotosensibilizada de las proteínas provoca cambios conformacionales precedidos o acompañados por uniones de proteínas.

### **Fotooxidación por radiación UV**

El epitelio del cristalino y el córtex más externo absorben toda la radiación UVB que llega al cristalino.

La exposición a radiación UVB aumenta el riesgo de catarata cortical.

Los principales cromóforos que absorben UVB son: el ADN nuclear de las células epiteliales y el Trp de las cristalinas del córtex.

El sist. enzimático protector contra las oxidaciones está concentrado en las células epiteliales del cristalino.

La radiación UVB produce fotoproductos pirimidina del ADN, que llevan a ARN<sub>m</sub> alterado, lo que a su vez, producirá proteínas estructurales y enzimáticas alteradas, favoreciéndose la formación de catarata.

La radiación UVA produce retardo del crecimiento celular, mutagénesis, y también inhibición de los sist. celulares reparadores, mediante reacciones de fotosensibilización dependientes de oxígeno (tipo I y tipo II).

### **Fotosensibilización por fotoproductos del Trp**

NFK, KUA, y otros fotoproductos del Trp tienen propiedades fotosensibilizadoras.

El fotoproducto más importante es el NFK, que es inestable en solución acuosa, pero estable cuando se une a proteínas.

El peak de absorción del NFK está en los 318 nm.

El NFK tiene gran capacidad para actuar como un fotosensibilizador endógeno con radiación UVB y UVA.

La fotosensibilización del Trp promueve la oxidación de otros aminoácidos mediante la acción de UVB sobre fotosensibilizadores endógenos (NFK, KUA, otros).

$^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y  $\cdot\text{OH}$  (pero no  $\text{O}_2$ ) pueden oxidar al Trp formando NFK, acelerando de esta manera la fotooxidación de las cristalinas.

### **Fotooxidación mediante luz visible**

La luz visible de  $\lambda$  corto es absorbida por cromóforos endógenos (riboflavina, y componentes amarillos relacionados con la edad). Además, fotosensibilizadores endógenos como algunas drogas (ptalocianinas, porfirinas, o psoralenos) pueden ingresar al cristalino durante fototerapias.

Estos cromóforos absorben luz visible y actúan como fotosensibilizadores, provocando daño fotooxidativo mediante la generación de especies de  $\text{O}_2$ .

El azul de metileno, rosa bengala, o las hematoporfirinas, producen inactivación de las enzimas por medio del mecanismo  $^1\text{O}_2$  en presencia de luz visible.

Riboflavina + luz favorece la unión de cristalinas.

GSH es inactivado en presencia de riboflavina (o azul de metileno) + luz.

Fotooxidación con riboflavina se lleva a cabo por mecanismo tipo I, formándose  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La conformación proteica influye en el tipo de reacción que se produzca (I o II). La tipo I se ve favorecida por una baja concentración de  $\text{O}_2$ .

### **Fotooxidación y catarata**

La transparencia del cristalino normal se debe al ordenamiento espacial de los agregados supramoleculares de las proteínas y membranas del cristalino, lo que disminuye la dispersión de la luz por efecto interferencia.

La formación de catarata resulta de dos cambios a nivel macromolecular:

-el aumento de tamaño de los elementos dispersores de luz ( $>\lambda/20$ ).

-el aumento de la diferencia de los índices de refracción entre los elementos dispersores de luz y su medio circundante.

## ELEMENTOS DISPERSORES DE LA LUZ: Agregados proteicos

### I) Identificación de elementos dispersores responsables de opacificación en la catarata por frío (Biophys. J. Vol 3; 1982)

Existen dos tipos de dispersores de luz en los cristalinos intactos:

-pequeñas unidades de 100 Å de radio. No participan en los fenómenos de opacificación. Las partículas de radio=80Å serían  $\alpha$  cristalinas. Por lo tanto, estas pequeñas unidades dispersoras de luz serían principalmente  $\alpha$  cristalinas.

-grandes elementos de alrededor de 1500 Å de radio. El tamaño de estas partículas es de un rango amplio, pero el valor promedio es de 1500 Å. En el núcleo se alcanzan valores entre 2000-5000 Å. Son responsables de la opacificación de la catarata por frío.

Con el frío se produce catarata debido al aumento de la dispersión de la luz por los elementos dispersores grandes.

### II) Microscopía electrónica de agregados de $\alpha$ cristalinas nativas y reconstruidas (CER Vol 7 N° 1; 1988)

Las  $\alpha$  cristalinas están formadas por uniones combinadas de subunidades  $\alpha A$  y  $\alpha B$ . Pero es posible construir homólogos de  $\alpha$  cristalinas sin combinar sus subunidades.

El PM de las subunidades (c/u) = 20 kD.

Ya que las  $\alpha$  cristalinas presentan un rango de PM relativamente amplio, es posible pensar que debe haber un tamaño mínimo de  $\alpha$  cristalina sobre el cual se "generan" los otros tamaños (por agregación).

Según la técnica de extracción tenemos:

- $\alpha_c$ , que es aquella extraída a 4 °C, y que presenta un PM de 800kD.

- $\alpha_m$ , que es aquella extraída a 37 °C, y que presenta un PM de 320 kD.

En este estudio se evaluaron tres tipos de  $\alpha$  cristalinas:

a)  $\alpha_m$ : sus tamaños son de 6,2+/-1,3 nm de diámetro. De forma irregular. Y con una relación  $\alpha A:\alpha B = \alpha_c$ .

b)  $\alpha_c$  : sus tamaños presentan una mayor variación, y son de  $10,5 \pm 2,5$  nm de diámetro. Se formaría por agregación de  $\alpha_m$  por efecto de la temperatura.

c)  $\alpha$  cristalina reconstruída : se reconstruyeron dos tipos :

-agregados  $\alpha_A$  ; con tamaños y forma uniforme ( $8,4 \pm 1,3$  nm de diámetro). Pueden superagregarse hasta formar moléculas de hasta 20 nm de diámetro.

-agregados  $\alpha_B$ ; son esféricos, y con un tamaño promedio de  $9,1 \pm 1,2$  nm de diámetro. No se superagregan.

Existiría una relación entre el tamaño de las  $\alpha$  cristalinas y la cantidad de cambios posttranslacionales sufridos por la proteína (especialmente la degradación C-terminal de  $\alpha_A$ ).

Al parecer  $\alpha_A$  participaría en la estabilización de las  $\alpha_c$  .

Según estudios de Augusteyn y colegas las  $\alpha_m$  estarían formadas por 12 subunidades, con una razón A:B = 2:1.

### **III) Acerca de la estructura 4ª de las proteínas HMW de cristallinos bovinos**

(Eur. J. Biochem. 50:503-9; 1975)

Estudios con microscopía electrónica de HMW muestran que son agregados de  $\alpha$  cristalinas de LMW.

El diámetro de las  $\alpha$  cristalinas = 18 nm app.

Las HMW presentan diámetros variados. Los mayores son del orden de 500 nm. Las proteínas HMW están formadas por subunidades globulares de 18 nm de diámetro.

## $\alpha$ cristalinas

### **I) El efecto de la fosforilación en la estructura de la $\alpha$ cristalina**

(Bioch. Biophys. Acta 999:293-99; 1989)

Las  $\alpha$  cristalinas pueden fosforilarse mediante reacción dependiente de  $AMP_c$ . La subunidad A sufre mayormente fosforilación, sobretodo en Ser 122, lo que altera su conformación.

Con la edad se produce un aumento de fosforilación.

La fosforilación altera la conformación de  $\alpha A$  pero no su asociación para formar  $\alpha$  cristalina.

Se construyeron homopolímeros con subunidades fosforiladas ( $A_1$  y  $B_1$ ) y no fosforiladas ( $A_2$  y  $B_2$ ). Cada uno de estos agregados (4) formó partículas de 9,3-9,5 nm de diámetro.

Los radios hidrodinámicos fueron del orden de 7,1-8,1 nm, medidos por dispersión luz. Por microscopía electrónica las medidas fueron 4,6-4,8 nm de diámetro.

Por lo tanto, la fosforilación produce una alteración en  $\alpha A$  principalmente. La fosforilación de Ser 122 lleva a una mayor exposición de Trp 9 y Cis 131.

En cristalinos bovinos jóvenes un 3-5% de los grupos sulfhidrilos de la subunidad  $\alpha A$  están expuestos, mientras que en los cristalinos viejos el 35% (debido a la fosforilación).

Se postula que la  $\alpha$  cristalina es un dodecámero.

La fosforilación provoca una alteración de la capacidad de interacción de la  $\alpha$  cristalina con otros constituyentes del cristalino (actina, citoesqueleto, mb.).

### **II) Estructura 4ª de $\alpha$ cristalina de cristalinos de ternero: un modelo tetrahédrico de 3 capas**

(J. Mol. Biol. 192: 711-24; 1986)

Las  $\alpha$  cristalinas son partículas globulares polidispersas, formadas por 2 subunidades (A y B).

El PM de cada subunidad es de 20 kD.

Una  $\alpha$  cristalina presenta aproximadamente en promedio 40-50 subunidades, o más (dependiendo del Ph, la fuerza iónica, la  $T^\circ$ , etc).

Las  $\alpha$  cristalinas son las que más dispersan luz en el cristalino (dispersión sin opacidad en cristalinos sanos)

La relación  $\alpha A:\alpha B = 3:1$ .

Se plantean varios modelos para la estructura de la  $\alpha$  cristalina:

a) *Modelo de Bindels (1979)*:  $\alpha$  cristalina presentaría una estructura 4ª en la que las subunidades están ordenadas en 3 capas concéntricas, cada una de las cuales tiene (de dentro a fuera) 14+/-2 subunidades A, 13+/-3 subunidades (10+/-2 A y 3+/-1 B), y 15+/-2 subunidades (7+/-1 A y 8+/-1 B).

b) *Modelo de Tardieu (1986)*:  $\alpha$  cristalina presentaría una estructura 4ª con forma de un tetrahedro de 3 capas. En la primera capa habría 12 subunidades, en la segunda 24, y en la tercera 24.

Este modelo explica la gran sensibilidad de la estructura de la  $\alpha$  cristalina al medio ambiente.

Estudiando  $\alpha_c$  de ternero, mediante dispersión rayos X, se obtuvo que: PM promedio = 840+/-80 kD; Radio de Giro = 61+/-1 Aº; Radio hidrodinámico = 88+/-2 Aº. Estos resultados varían según las condiciones de experimentación (Tº, Ph, etc.).

En este trabajo se determinó también que al aumentar el Ph (de 6,8 a 11) se produce un descenso del PM, del R. de G., y del R. H.; y que al aumentar la Tº (de 45ºC hacia arriba) se produce un descenso del R.H.

Por lo tanto, se concluye que la  $\alpha$  cristalina es altamente sensible a las condiciones fisicoquímicas.

Los modelos que se han postulado para la estructura de la  $\alpha$  cristalina se pueden clasificar en 2 tipos:

a) Modelo de multicapas: que puede dividirse en: - *de simetría tetrahédrica*; que se basa en estudios con  $\alpha_c$ , que demuestran que ésta estaría construida por subunidades ensambladas similarmente al caso de un virus. Este modelo se caracteriza porque idénticas subunidades están en posiciones equivalentes y relacionadas por simetría de ejes, las subunidades interactúan por uniones no covalentes, el ensamblaje tiende a minimizar el número de contactos diferentes, y las subunidades no pueden ubicarse en simetría de ejes (a diferencia del modelo de Bindels). En este modelo la 1ª capa presenta más que 8 subunidades (12), la 2ª y 3ª capas, con simetría tetrahédrica, deben tener 12, o múltiplos de 12, subunidades (2ª capa = 24 subunidades aprox., y 3ª capa = >24 subunidades). La simetría exige un mínimo de 12 subunidades por capa. El radio de una subunidad = 18,5 Aº aprox. El radio de la 1ª capa = 35 Aº. El radio de la 2ª capa = 59,8 Aº. Y el radio de la 3ª capa = 86,5 Aº.

En caso de agregación debida al envejecimiento se añadirían subunidades desnaturalizadas (por cambios postranslacionales) sin romper la estructura completa de la  $\alpha$  cristalina. Esta agregación de subunidades alteradas se lleva a cabo a nivel de la 3ª capa.

- *de 3 capas (Bindels)*; en este modelo las partículas serían isométricas, con las subunidades organizadas en capas concéntricas esféricas. El número de subunidades = PM partícula/PM subunidad (20kD). Cada subunidad mide aprox. 18 Aº de radio. Las subunidades se ordenan en una segunda capa de radio = 62,2 Aº, con 15<n<36, y en una 3ª capa de radio = 84,2 Aº, con n>36. Hay discordancias con este modelo.

b) Modelo multímero: en que las especies de  $\alpha$  cristalinas se producirían por asociación de múltiples unidades básicas (oligómeros).

### III) Una posible estructura para $\alpha$ cristalina

(FEBS 222; 1: 1-5; 1987)

Las  $\alpha$  cristalinas presentan una variabilidad importante en su tamaño debido a su sensibilidad al medio.

Se postula que la  $\alpha$  cristalina tiene propiedades de una proteína micelar debido a que presenta una gran división de sus secuencias de aminoácidos en hidrofóbicas e hidrofílicas.

La concentración de cristalinas en el cristalino = 600 mg/ml.

La  $\alpha$  cristalina presenta subunidades A y B, cada una de ellas con PM = 20 kD, que pueden alterarse por deamidación, fosforilación, etc.

La proporción de las subunidades para formar  $\alpha$  cristalinas varía de especie a especie, y con la edad.

Las subunidades tendrían las mismas estructuras tridimensionales, y ocuparían los mismos sitios en los agregados ( $\alpha$  cristalinas).

EL PM promedio de la  $\alpha$  cristalinas = 800 kD (320 kD < PM < 15 MD). Esta variación del PM no depende de la concentración proteica.

Las distintas  $\alpha$  cristalinas (de distinto PM) no estarían en estado de equilibrio, sino que la T°, el Ph, las fuerzas iónicas, y los iones específicos, alterarían su tamaño .

El tamaño de la  $\alpha$  cristalina = 6 a >20 nm de diámetro, y con forma esférica. Según microscopía electrónica (no teoría).

### Modelos de $\alpha$ cristalina

#### Modelo de estructura 4<sup>a</sup> (Hoenders)

$\alpha$  cristalina presentaría 3 capas, la central presentaría sólo  $\alpha$  A, y la más externa permitiría la adhesión de otras partículas al transcurrir la edad.

#### Modelo tetrahédrico

$\alpha$  cristalina sería un dodecámero simétrico.

#### Modelo micelar

Una micela es un agregado, por autoensamblaje, de moléculas anfifílicas orientadas con su región apolar lejos del solvente. Esto disminuye la energía libre, con una entropía fuertemente positiva.

La formación inicial de la micela ocurre dentro de un rango estrecho de concentración para condiciones ambientales determinadas (concentración crítica micelar), y los agregados formados son esféricos.

A altas concentraciones la micela toma formas cilíndricas y/o de bicapa. Por esto, el tamaño y la forma de la micela pueden ser muy variables.

En un solvente polar el corazón de la micela esférica no podrá ser mucho mayor en tamaño que el largo de 2 regiones no polares. Una vez formada, la micela se estabiliza por medio de una combinación de efectos entrópicos y de interacciones entre las moléculas de la región hidrofílica y el solvente. No hay interacciones específicas entre las moléculas hidrofóbicas del corazón (libres para moverse y rotar).

En este modelo no habría una única organización estructural de las subunidades de la superficie y de las internas.

Estudios de las subunidades arrojan que los aminoácidos 1-63 (dominio N-terminal) de las  $\alpha$ A son fuertemente hidrofóbicos. Mientras que los otros son hidrofílicos. Los aminoácidos 1-63 están ubicados en el centro.

Se ha observado que hay un aumento del tamaño de la  $\alpha$  cristalina con el aumento de la concentración proteica (edad). Además, todas las subunidades están en posiciones equivalentes y accesibles a la superficie.

Con el envejecimiento, y con la innata licuefacción del interior de la micela, es posible que ocurran interacciones específicas debido al movimiento de las subunidades. Esto, más los trastornos del agua intracelular, favorecería la formación de catarata.

**IV) Acerca de la estructura de la  $\alpha$  cristalina: el mínimo PM**  
(CER Vol 7, N°6; 1988)

Según la T° usada para aislar  $\alpha$  cristalina se obtiene:

- a)  $\alpha_m$  ; aislada a 37°C, y de PM = 291-368 kD. Polimerizaría con el frío (4°C) o con la edad, formando agregados.
- b)  $\alpha_c$  ; aislada a 4°C, y de PM = 604-700 kD.

El PM de la  $\alpha$  cristalina varía según los modos de análisis.

**Especies mínimas de fraccionamiento**

Para las especies mínimas se han obtenido PM de 280 y 529 kD.

La intensidad de luz dispersada es proporcional al radio molecular a la 6ª potencia .

Las fracciones de bajo PM (especies mínimas) tienen un PM de 280 y 529 kD para  $\alpha_m$  y  $\alpha_c$  respectivamente. Estas estarían formadas por 14+/-1 y 26+/-2 subunidades. Podría ser que, dada la polidispersidad de las  $\alpha_c$  y  $\alpha_m$  , el PM y el mínimo número de subunidades sea menor.

$\alpha_m$  son partículas esféricas de 6,2 nm de diámetro.

$\alpha_c$  son partículas esféricas de 10,5 nm de diámetro.

Los agregados proteicos (opacidades) son polímeros de las especies mínimas (dímeros, trímeros, etc.), lo que explica la polidispersidad de estas macromoléculas.

Por lo tanto, la  $\alpha$  cristalina es una proteína micelar que puede albergar varias subunidades.

## Bioquímica de la Catarata (Ocular Lens)

### Proteínas

El contenido proteico en la periferia del cristalino es de un 35% de su peso húmedo. Y de un 40% en la región central.

#### $\alpha$ cristalina

Recién sintetizada presenta un PM de 700 kD, pero con la edad alcanza un PM de 1000 kD, lo que da cuenta de su heterogeneidad.

Está formada por polipéptidos (A y B) unidos por fuerzas no covalentes. La proporción A:B en las céls. epiteliales es de 1:3, en las céls. en proceso de diferenciación 3:2, y 3:1 en las céls. fibrilares. La cadena B es más alcalina.

Todos los polipéptidos presentan un NH<sub>2</sub> terminal bloqueado por un grupo acetil metionina, salvo en el caso de las  $\gamma$  cristalinas.

El Ca<sup>+2</sup> participa en la formación de HMW, pero no se requiere para la estabilización de dichas moléculas.

#### $\beta$ cristalina

Es un grupo de proteínas cuyos PM=4·10<sup>4</sup> a 2,5·10<sup>5</sup> D.

Presentan subunidades unidas no covalentemente.

Son proteínas ricas en grupos thiol.

#### $\gamma$ cristalina

Sólo se presenta en forma monomérica.

Es rica en grupos thiol.

Son más básicas que las  $\alpha$  cristalinas.

Presentan un PM=20 kD.

#### Proteínas citoesqueleto

-Filamentos delgados: formados por actina; espesor = 7 nm.

-Filamentos intermedios: formados por vimentina (que disminuye con la edad); espesor = 10 nm.

-Microtúbulos.

#### Proteínas de membrana

-Intrínsecas: bomba Na-K, etc.

-Extrínsecas: polipéptido 43 kD (puede presentar actina en pequeñas cantidades).

La concentración de proteínas influye en la solubilidad de las mismas. Por lo tanto, en el córtex hay más solubilidad que en el núcleo.

Alrededor de los 60 años el cristalino presenta un 50% de proteínas insolubles. En jóvenes este % (menor) se debe a las proteínas de membrana y matriz celular.

Con la edad este % aumenta, debiéndose al aumento de proteínas insolubles (cristalinas).

Normalmente las proteínas están en estado soluble gelatinoso.

Los HMW se forman por agregados de  $\alpha$  cristalinas y de otras cristalinas.

En cristalinos normales se observan HMW no covalentes. Pero en cristalinos cataratosos se observan HMW covalentes. Por lo tanto, se sugiere que los HMW serían los precursores de las fracciones insolubles en agua.

## Lípidos

El 50% de los lípidos del cristalino es colesterol (en membrana).

El mayor fosfolípido es la esfingomielina.

Los ácidos grasos son principalmente saturados (sólo el 2% son insaturados), lo que otorga rigidez a la membrana celular, sobretodo en las regiones más internas del cristalino.

## Metabolismo y reacciones de óxido-reducción

El consumo de glucosa del cristalino = 5  $\mu\text{mol}$  de glucosa por hora por gr. de peso húmedo.

La vía hexosa monofosfato produce 2 mol NADPH/cada glucosa metabolizada.

El glutatión es sintetizado en el cristalino. Su concentración en el epitelio = 60  $\mu\text{mol/gr.}$  peso húmedo.

En el epitelio hay más glutatión thiol que proteínas thiol. En el córtex disminuye esta concentración, pero más aún en el núcleo, resultando como promedio una concentración de 10  $\mu\text{mol/gr}$  en todo el cristalino.

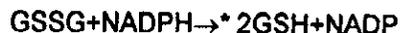
### Sistemas de detoxificación de agentes oxidantes

Varias enzimas se encargan de detoxificar al cristalino:

**Catalasa:** participa en la reacción  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . Se encuentra en bajos niveles, y no es eficiente para eliminar pequeñas cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pues presenta un  $K_m$  relativamente alto.

**Glutatión peroxidasa:** participa en la reacción  $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$ . En esta reacción el glutatión es el cofactor. La glutatión peroxidasa contiene Se, y presenta un  $K_m$  bajo para el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y es capaz de hidrolizar hidroperóxidos.

Nota: el glutatión es clave en la defensa del cristalino frente a agentes oxidantes. El GSSG (glutatión oxidado) puede ser reducido por la **Glutatión reductasa**:

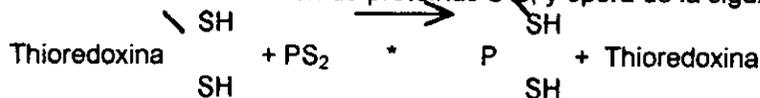


Es posible también que el glutatión sea capaz de reaccionar espontáneamente con proteínas S-S:

$\text{PSSP} + \text{GSH} \rightarrow \text{PSSG} + \text{PSH}$  y luego  $\text{PSSG} + \text{GSH} \rightarrow \text{PSSG} + \text{GSH}$ , donde \* es la enzima glutatión reductasa (en presencia de NADPH).

En los pacientes cataratosos se observa que la glutatión reductasa aún está activa, y que el shunt hexosa monofosfato está operacional. Pero en ellos se presentan S-S, lo que haría pensar que este mecanismo enzimático no es fundamental para reducir proteínas S-S.

**Sistema thioredoxina:** este sist. consiste en: una proteína dithiol (thioredoxina) de 12 kD; la enzima thioredoxin reductasa, que es un dinucleótido de adenina y flavina.; y NADPH. Este sist. es altamente efectivo en la reducción de proteínas S-S, y opera de la siguiente manera:

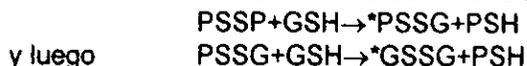


\* NADPH y Thioredoxin reductasa

La thioredoxina es un reductor relativamente potente, con un  $E_0 = -0,2 \text{ V}$  a  $\text{Ph} = 7,0$  (en comparación a  $E_0 = -0,25 \text{ V}$  del glutatión) para un polipéptido aislado de *E. Coli*.

La thioredoxina requiere ditionoles para su reducción, no se reduce con monotionoles. (como en el caso del glutatión).

**Thiol transferasas:** estas enzimas catalizan thiol-disulfidos, utilizando glutatión:



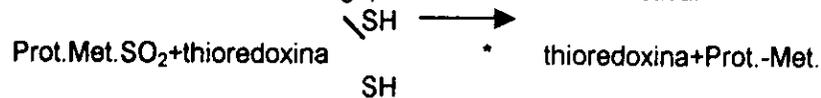
\*Thiol transferasa

El GSSG es luego reducido por glutatión reductasa y NADPH.

Nota: los PSSP nativos son relativamente resistentes a la reducción. Sólo son accesibles a estos sist. enzimáticos los PSSP formados por insulto oxidativo.

No sólo son oxidados los grupos thiol, también pueden sufrir oxidación los grupos S-CH<sub>3</sub> de la metionina, formándose sulfóxido de metionina.

Habría una enzima que reduce a la metionina disulfida. En este caso los monothioles (glutatión) son inefectivos como cofactores. Sin embargo, la thioredoxina es efectiva:



\*Thioredoxin reductasa, Metionin reductasa, y NADPH.

### Cambios en la estructura de las cristalinas en la catarata

Las opacidades son el resultado final de una serie de procesos químicos complejos. Por lo tanto, un cristalino transparente no es necesariamente un cristalino sano.

Agregados HMW con PM mayores o iguales que 50·10<sup>6</sup> D. son capaces de dispersar luz y producir catarata.

En cristalinos normales la disminución de la transparencia con la edad se debe a la acumulación de polímeros unidos no covalentemente. En dichos cristalinos inicialmente se forman estos HMW (solubles e insolubles) en el núcleo, y no involucran enlaces covalentes de monómeros.

Sin embargo, en la catarata se acelera la formación de HMW insolubles, que involucra enlaces covalentes de monómeros, y no está limitado a la región nuclear.

disulfuros (predominantemente)

Los HMW covaltes

otros (minoritariamente)

Se ha observado que la cantidad de HMW no implica necesariamente opacidad, es importante también el cambio cualitativo, que implica alteraciones en el índice de refracción (sinéresis?).

En resumen, los puentes de unión de los agregados proteicos formados en cristalinos normales de ancianos con pérdida de transparencia son débiles, no covalentes. No presentan puentes S-S, a diferencia de los HMW de cataratosos (estabilización por S-S).

Los agregados proteicos están formados por tres tipos de polipéptidos de 43, 20, y 10 kD, y por material no descrito (a la cromatografía). El polipéptido de 20 kD derivaría de los polipéptidos de las cristalinas. El de 10 kD sería trozos de cristalinas. Y el de 43 kD sería una mezcla.

En general, todos los agregados con S-S presentan el polipéptido de 43 kD, que sería una proteína extrínseca de mb., lugar donde se inicia la catarata. Por otro lado, se sabe que la proteína que mayormente se une a la mb. es la  $\gamma$  cristalina, o derivados de ésta.

En pacientes ancianos no cataratosos se observa que la oxidación está confinada a la mb. o a los componentes asociados a ella. En cambio, en pacientes cataratosos la oxidación se extiende al citosol (>50% Met. y 75-100% Cis. están oxidados, sobretodo a nivel mb.). Nota: ¿por paso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de mb.?, ¿lo que implica que sist. enzimáticos defensivos están en la mb.?

En cristalinos normales los thiol están (en su mayoría) escondidos. En cambio, en la catarata están expuestos.

Para la exposición de los thioles debe ocurrir, primero, oxidación de algunos grupos y/o cambios posttranslacionales. lo que produce alteraciones conformacionales, y exposición.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros agentes oxidantes

Los agentes oxidantes provienen del exterior del cristalino.

Los cataratosos presentan altos niveles de  $H_2O_2$ , que puede oxidar Cis. y Met. La alta concentración de  $H_2O_2$  en el humor acuoso se relaciona con una alta concentración del mismo en el cristalino.

Además, una alta tensión de  $O_2$  provoca oxidación. El  $O_2$  es reducido por una serie de reacciones univalentes que producen intermediarios altamente tóxicos (superóxido,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ,  $H_2O\cdot$ ).

En los sistemas biológicos la reducción de  $O_2$  ocurre en la superficie de las enzimas, y es inocuo. Pero en otras situaciones pueden producirse radicales libres.

El ác. ascórbico, que está en el cristalino y en su medio ambiente, puede actuar como reductor y como atrapador de radicales libres, generando  $H_2O_2$ .

Ac. ascórbico+luz+ion metálico o riboflavina  $\rightarrow H_2O_2$

Algunos oxidantes pueden reaccionar con componentes biológicos y formar nuevos radicales (superóxido reacciona con ác. grasos poliinsaturados formando peróxidos lípidos, que pueden romperse y formar malondialdehídos (altamente reactivos), que pueden reaccionar formando bases Schiff con grupos de aminoácidos de proteínas o fosfolípidos, llevando a componentes fluorescentes o pigmentados).

#### Ca<sup>+2</sup> y catarata

Una bomba mantiene bajos niveles de calcio en el interior del cristalino. Esta bomba es sensible al daño oxidativo, por lo que se observa un aumento de calcio en la catarata.

#### Proteolisis y catarata

No sólo la agregación de proteínas participa en la cataratogénesis, también la proteolisis de proteínas desnaturalizadas.

Las alteraciones estructurales de las proteínas desnaturalizadas provoca una exposición de zonas que son susceptibles a la proteolisis. Los trozos de proteína son, a su vez, partícipes de nuevas reacciones, como por ejemplo, formación de HMW. En la catarata nuclear muchos de los polipéptidos de 10 kD unidos a las HMW derivan de  $\gamma$  cristalinas proteolizadas.

#### Resumen

La serie de procesos que ocurren en la catarata se pueden resumir de la siguiente manera:

1° oxidación a nivel de mb. celular.

2° disminución del transporte de iones, lo que conlleva a un estímulo del metabolismo de la glucosa.

3° aumento del lactato intracelular.

4° disminución de la formación de ATP, lo que lleva a una alteración de la concentración de iones y a una disminución de la síntesis proteica.

5° oxidación del glutatión y de las proteínas del citosol (cristalinas).

6° alteración de la permeabilidad de la mb. celular (a Na y Ca principalmente).

7° aumento de la actividad proteolítica y de la transglutaminasa

8° formación de agregados proteicos S-S

9° ruptura de la mb. celular, con la consiguiente pérdida de proteínas de bajo PM, aumento de agua intracelular, y, en consecuencia, opacificación.

BIBLIOTECA CORFO