

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía II



**DESARROLLO POSTNATAL DE LAS PROTEÍNAS
CRISTALINAS PORCINAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Julio Ortega Usobiaga

Bajo la dirección de los doctores

Carlos Cortés Valdés

Antonio Suárez Sanz

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2073-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA II



**DESARROLLO POSTNATAL DE LAS
PROTEÍNAS CRISTALINAS PORCINAS**

TESIS DOCTORAL

por

Julio Ortega Usobiaga

Madrid 2001

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA II



DESARROLLO POSTNATAL DE LAS PROTEÍNAS CRISTALINAS PORCINAS

Directores: Dr. Carlos Cortés Valdés

(Departamento de Oftalmología. Hospital G.U. Gregorio Marañón. Madrid)

Dr. Antonio Suárez Sanz

(Unidad de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital G.U. Gregorio Marañón. Madrid)

TESIS DOCTORAL

por

Julio Ortega Usobiaga

Madrid 2001

A Enrique de Usobiaga y Marchal.

AGRADECIMIENTOS

A Antonio Suárez, por su dedicación continua en la dirección de esta Tesis Doctoral, su paciencia infinita conmigo y su apoyo en todo momento.

A Carlos Cortés, mi jefe durante cuatro años, que confió en que este proyecto podía realizarse y tuvo siempre abiertas las puertas de su despacho para mí.

Al Dr. García Barreno, director de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” de Madrid, por permitirme sentirme como en casa en sus dependencias desde el primer día y haberme escuchado críticamente en sus sesiones clínicas tantas veces.

A Marichi Guisasola, que fue la primera que me explicó qué era una Tesis Doctoral y a la que no recuerdo nunca hablar conmigo sin sonreirme; por su cariño y ayuda permanente.

A todos los demás miembros de Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, entre ellos Fernando Asensio y M^a Jesús Sánchez, que me aportaron sus puntos de vista en las exposiciones preliminares de este trabajo.

A Reyes y Miguel Ángel, secretarios de Carlos Cortés, y Elena, secretaria de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, que me animaron y tuvieron que “soportar” mis continuas visitas.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Oftalmología del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” / Instituto Oftálmico, con quien tantos momentos buenos pasé, entre ellos Basilio, “Chino”, Miriam, Jose, Almudena, M^a Carmen y tantos otros. Y a mis maestros, Pilar Balado, Pilar Gómez de Liaño, M^a Ángeles Teijeiro, Chema Urcelay, Javier Gómez, Enrique del Río, Marta Suárez, Pilar Vidal, Teresa Cuesta, Jorge Fernández de Castro... que me ayudaron a formarme como especialista y como persona.

A todas las personas que me han demostrado su amistad en mis treinta años de vida, Hugo, Rosa, Cristina Niño, Amelia, Ana, Gonzalo, Gloria, José Carlos, Sergio, Eduardo, Jorge, Nuria, Miguel, Eva, Enrique, Alicia, Esther, Concha, Sara, Abel, Ramón, Chimo, las “churris”...

A toda la gran familia de Bilbao, con Maruja y Amama al frente. Con especial cariño a Janko.

Y a las personas más importantes en mi vida, mis padres y mis hermanos, que pase lo que pase siempre estarán a mi lado, dispuestos a dar sin esperar recibir.

Muchas gracias a todos los que han hecho posible llegar hasta aquí.

*El cristalino encierra en su estructura citológica la
secuencia completa de su diferenciación pre y postnatal.*

Orts Llorca

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	4
I. Anatomía del cristalino	5
1. Anatomía macroscópica.....	5
2. Anatomía microscópica.....	6
II. Diferenciación del cristalino en vertebrados	8
1. Inducción de la formación de la vesícula cristaliniiana.....	8
2. Formación de las fibras cristalinas.....	10
3. Formación de las cristalinas.....	11
III. Clases de proteínas cristalinas	12
1. Composición química del cristalino.....	12
1.1. Proteínas.....	12
1.2. Azúcares.....	14
1.3. Lípidos.....	15
1.4. Solutos de bajo peso molecular.....	15
2. Familia de las proteínas α cristalinas.....	16
3. Familia de las proteínas β cristalinas.....	17
4. Familia de las proteínas γ cristalinas.....	18
5. Otras familias de cristalinas no humanas.....	19
IV. Modificaciones de las proteínas cristalinas	20
1. Insolubilización de las cristalinas.....	20
2. Modificaciones postraduccionales de las cristalinas.....	21
2.1. Desamidación, isomerización y racemización.....	21
2.2. Truncación.....	22
2.3. Fosforilación.....	23
2.4. Glicosilación.....	25
2.5. Glicación.....	25
2.6. Carbamilación.....	27
2.7. Acetilación.....	27
2.8. Transglutaminación.....	27
2.9. Oxidación y coloración del cristalino.....	28

3. Oxidación ocular.....	29
3.1. Estrés oxidativo en el ojo.....	29
3.2. Efecto de las radiaciones.....	30
3.3. Efecto del oxígeno.....	31
3.4. Efecto del peróxido de oxígeno.....	31
3.5. Prooxidantes en el ojo.....	32
3.6. Mecanismos de protección.....	33
3.7. Papel del metabolismo ocular de la vitamina C.....	34
3.8. Importancia del glutatión.....	34
V. Funciones de las proteínas cristalinas	36
1. Función estructural de las cristalinas.....	36
2. Estructura de la α cristalina.....	36
3. Estructura de las cristalinas β y γ	38
4. Proteínas de choque térmico.....	39
5. La familia de las α cristalinas como sHSP.....	40
6. Actividad tipo caperona molecular de la α cristalina.....	41
VI. Cambios en las proteínas cristalinas asociados a la edad	44
1. Generalidades.....	44
2. Familia de las α cristalinas.....	44
3. Superfamilia de las cristalinas β y γ	45
4. Polipéptidos degradados.....	46
OBJETIVOS	47
MATERIAL Y MÉTODOS	49
I. Material	50
1. Sustancias químicas.....	50
2. Animales empleados.....	50
3. Obtención de los cristalinos porcinos.....	50
II. Métodos	51
1. Preparación de los cristalinos.....	51
2. Cromatografía líquida de alta resolución con filtración en gel (GF- HPLC).....	51

3. Valoración de grupos carbonilo.....	52
4. Cuantificación de proteína.....	53
5. Análisis estadístico.....	53
RESULTADOS	54
I. Fracción soluble en agua.....	55
1. Estadística descriptiva.....	55
2. Estadística analítica.....	56
II. Contenido en grupos carbonilo.....	57
1. Estadística descriptiva.....	57
2. Estadística analítica.....	58
III. Contenido en proteína.....	59
1. Estadística descriptiva.....	59
2. Estadística analítica.....	62
IV. Fluorescencia no triptófano.....	65
1. Estadística descriptiva.....	65
2. Estadística analítica.....	68
V. Fluorescencia debida al triptófano.....	71
1. Estadística descriptiva.....	71
2. Estadística analítica.....	74
DISCUSIÓN	77
I. Porcentaje de fracción soluble en agua.....	78
II. Contenido en grupos carbonilo.....	79
III. Contenido en proteína.....	80
IV. Fluorescencia no triptófano.....	82
V. Fluorescencia debida al triptófano.....	84
CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	89
I. Bibliografía por orden de aparición.....	90
II. Bibliografía por orden alfabético.....	101

INTRODUCCIÓN

I. ANATOMÍA DEL CRISTALINO

1. Anatomía macroscópica

El cristalino es una estructura en forma de lente biconvexa aplanada de delante atrás cuyas características más relevantes son:

- Transparencia.
- Falta de vasos y nervios.
- Crecimiento continuo toda la vida (Wistow y Piatigorsky 1987)¹.
- Plasticidad (capacidad de acomodación).

El cristalino tiene la capacidad de enfocar en la retina los rayos luminosos que provienen del exterior. Su morfología puede cambiar, abombándose para enfocar los rayos provenientes de objetos cercanos (acomodación). Con la edad va perdiéndose la capacidad de acomodación (presbicia) y la transparencia (catarata).

Está recubierto por una membrana denominada cápsula cristalina o cristaloides. Su cara anterior tiene una zona más gruesa a unos 3 mm del centro; su cara posterior tiene también una zona más gruesa, pero junto al ecuador del cristalino (Nordmann 1954)².

Se sitúa en un plano inmediatamente posterior al iris, a 4-5 mm de la córnea. Entre el iris y el cristalino existe un espacio ocupado por humor acuoso (cámara posterior). Por detrás del cristalino se sitúa la cámara vítrea, de la que está separada por la hialoides anterior. La cristaloides posterior se une a la hialoides anterior mediante el ligamento hialoideo-capsular de Berger-Wieger, que es circunferencial, con unos 5 mm de diámetro; este ligamento delimita el área de Vogt. Periféricamente, la hialoides anterior y la cristaloides posterior se separan (canal de Hannover).

El cristalino se une al cuerpo ciliar mediante las fibras zonulares (zónula de Zinn), que se insertan a nivel del ecuador en dos planos anterior y posterior, separados por el espacio de Petit.

Sus dimensiones son (Saraux et al 1985)³:

- Diámetro frontal : 9-10 mm.
- Diámetro anteroposterior: 4 mm.
- Radio de curvatura de la cara anterior: 10 mm (6 mm en acomodación).
- Radio de curvatura de la cara posterior: 6 mm (5'5 mm en acomodación).
- Peso: 190-220 mg.

2. Anatomía microscópica

La **cápsula** es una membrana anhistá, compuesta de colágeno (Pirie 1951)⁴, en la cual se pueden distinguir tres elementos:

- Laminilla zonular. Sólo existe a nivel ecuatorial y es la parte más superficial. Está atravesada por las fibras zonulares
- Membrana pericapsular. Capa situada bajo la anterior, de 1-2 μm de espesor.
- Cristaloides propiamente dicha. Se sitúa por dentro de la membrana pericapsular. Su grosor es de 20 μm .

El **epitelio del cristalino** es una capa de células aplanadas situada en la cara anterior del mismo. Son más altas cuanto más cerca del ecuador se sitúan (13-22 x 2-5 μm en el polo anterior y 8-12 x 9-15 μm en el ecuador). Se denomina zona germinativa al grupo celular situado en la zona más ecuatorial. En esta zona las mitosis son mucho más frecuentes. Las células que se van creando se van alejando de la cápsula.

Las **fibras cristaliniánas** se originan a partir de la zona germinativa. Con el tiempo van alargándose, con una dirección anteroposterior. Su sección transversal es hexagonal. Se ha descrito una matriz extracelular o “cemento” entre la cristaloides y las

células cristaliniánas, así como entre las fibras. El “cemento” interfibrilar constituye las suturas del cristalino, que son las zonas en las que se insertan las fibras.

La capa de fibras más periférica es la que está constituida por fibras más jóvenes, que se han superpuesto al resto más recientemente. Constituye la corteza cristaliniána o córtex. Las fibras de la zona central han perdido el núcleo celular y las organelas citoplásmicas; forman el núcleo del cristalino.

Las fibras cristaliniánas siguen una dirección anteroposterior, pero no rectilínea, sino con una trayectoria curvilínea de convexidad hacia el ecuador. La unión de los puntos de inserción anterior de las fibras forma una estructura en forma de “Y” (sutura anterior), mientras que las inserciones posteriores delimitan una “Y” invertida (sutura posterior). En la zona más periférica el trayecto no está aún bien definido (torbellino cristaliniáno de Schwalbe).

Mediante **biomicroscopia** se distinguen las siguientes regiones concéntricas, de dentro afuera, en el cristalino adulto:

- Núcleo embrionario interno. Formado hasta el quinto mes del desarrollo embrionario.
- Núcleo embrionario externo o fetal. Formado antes del nacimiento.
- Núcleo adulto. Formado antes de la pubertad.
- Corteza. Formado a partir de la pubertad.

II. DIFERENCIACIÓN DEL CRISTALINO EN VERTEBRADOS

1. Inducción de la formación de la vesícula cristaliniana

El embrión humano de 22 días presenta dos surcos a cada lado del prosencéfalo, denominados **surcos ópticos** y considerados como primera manifestación del ojo en desarrollo (Sadler 1985)⁵.

Una vez cerrado el tubo neural, hacia las cuatro semanas del desarrollo, los surcos ópticos aparecen como evaginaciones del neuroectodermo denominadas **vesículas ópticas**.

El ectodermo superficial más próximo a la vesícula óptica comienza a engrosarse, formando la **placoda cristaliniana**. Se ha supuesto desde hace un siglo que la vesícula óptica induce la formación de la placoda cristaliniana (Spemann 1901)⁶. Sólo una zona del ectodermo superficial puede ser, por tanto, capaz de diferenciarse hacia placoda cristaliniana; parece ser que la vesícula óptica sería importante en la localización de esta zona (Grainger et al 1997)⁷. Las moléculas inductoras no se conocen demasiado, pero su acción se ha estudiado ampliamente. Así, en el ectodermo superficial que va a formar la placoda cristaliniana, se activan determinados genes reguladores, como el del factor de transcripción Pax-6 (Altmann et al 1997)⁸. El gen Pax-6 continuará siendo expresado en el epitelio cristaliniano durante el desarrollo embrionario y postnatal. Se han descrito otras familias de genes relacionadas con factores de transcripción durante el desarrollo cristaliniano, como L-Maf y Sox-1 (McAvoy et al 1999)⁹.

Se supone que existe una comunicación entre el epitelio de la vesícula óptica y el epitelio de la futura placoda cristaliniana. Células de ambos epitelios desarrollan prolongaciones para contactar entre sí antes de formarse la placoda cristaliniana (McAvoy 1980)¹⁰.

Poco después, la placoda cristaliniiana y la vesícula óptica se invaginan, formando ésta la **cúpula óptica**. Finalmente, se produce tal invaginación de la placoda cristaliniiana que se separa del resto del ectodermo superficial, creando la **vesícula cristaliniiana** (embrión de 9 mm). Las muerte de las células situadas en el límite de la placoda cristaliniina podrían ser fundamentales en este proceso, denominado obliteración (Silver y Hugues 1973)¹¹. Existe una matriz de glicosaminoglicanos, glicoproteínas y colágeno entre la placoda cristaliniiana y la cúpula óptica que aumenta durante la inducción de la formación de la vesícula cristaliniiana. Existe una sustancia responsable de la inducción, cuyo peso molecular se ha calculado en menos de 12 kilodaltons (kDa).

La vesícula cristaliniiana es esférica, hueca y formada por una capa única de células cilíndricas. Éstas y el mesodermo adyacente formarán la cápsula del cristalino (Hamilton et al 1975)¹².

Una vez inducida la formación de la vesícula cristaliniiana es necesaria una influencia continua por parte de la retina neurosensorial en desarrollo. La lentropina, cuyo peso molecular es de 60 kDa, es la sustancia que estimula la elongación de fibras cristaliniianas primarias y la síntesis de δ cristalina en el embrión de pollo (Piatigorsky 1981)¹³.

Las fases en la formación de la vesícula cristaliniiana se describieron en el embrión de pollo (Shinohara y Piatigorsky 1976)¹⁴:

- 35 horas: el epitelio ectodérmico presumiblemente cristaliniiano ya es visible.
- 45 horas: elongación de las células epiteliales.
- 49 horas: ya está formada la placoda cristaliniiana.
- 52 horas: invaginación de la placoda.
- 55 horas: se vislumbran las presuntas fibras cristaliniianas primarias, formadas por elongación de las células posteriores de la futura vesícula cristaliniiana.
- 60 horas: ya está formada la vesícula cristaliniiana.

2. Formación de las fibras cristalinas

Las células de la pared anterior de la vesícula disminuyen de altura y forman el **epitelio cristalino**. Las células de la pared posterior de la vesícula (incluso antes de formarse ésta) se alargan hacia delante, formando las **fibras cristalinas primarias**. Estas fibras forman inicialmente lo que se conocía como botón cristalino de Kölliker. Hacia la séptima semana del desarrollo embrionario llegan a la pared anterior de la vesícula.

Las células del epitelio cristalino de la región ecuatorial de la vesícula forman la **zona germinativa del cristalino**. Estas células se dividen, sin dejar de hacerlo durante el periodo postnatal, sufren una elongación y se diferencian en nuevas fibras, que se superponen a las ya formadas y que se denominan **fibras cristalinas secundarias**. La aposición sucesiva de fibras lleva a la formación de las suturas cristalinas, que son las zonas donde se reúnen las fibras (Saraux et al 1985)³. La maduración de las fibras sigue el siguiente proceso:

- Elongación.
- Disminución de la formación de RNA.
- Degradación del DNA nuclear y pérdida de organelas citoplasmática.

De este modo, el cristalino encierra en su estructura citológica la secuencia completa de su diferenciación pre y postnatal (Orts Llorca 1984)¹⁵.

Hace cuatro décadas ya se intuía que es el distinto ambiente que rodea a las paredes anterior y posterior del cristalino (acuoso y vítreo, respectivamente) lo que influye en el desarrollo del epitelio y de las fibras cristalinas (Coulombre y Coulombre 1963)¹⁶. Actualmente, la investigación se centra en la acción de los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) sobre el esbozo cristalino. De los 18 tipos de FGF, se han descrito el FGF-1 y el FGF-2, rodeando al cristalino, y el FGF-12, expresado en el cristalino. La concentración de FGF parece ser fundamental en la proliferación, migración y diferenciación hacia fibras cristalinas. La hipótesis del gradiente de FGF se basa en la concentración de FGF creciente en sentido

anteroposterior, que haría que sólo en la zona posterior se formaran fibras (McAvoy 1991)¹⁷. Otros factores presentes en el vítreo podrían modular los efectos de los FGF.

3. Formación de las cristalinas

La primera cristalina en aparecer en ratas y ratones es la α (en la placoda). Es también la primera cristalina en aparecer en el epitelio central y en las fibras cristaliniánas. En pollos es la δ la primera en aparecer (en la placoda); también coincide con la primera en aparecer en epitelio central y fibras. En salamandras es la β la primera en aparecer en las fibras primarias, epitelio central y fibras secundarias.

En los ratones, no es necesario que se forme el cristalino para que aparezcan proteínas cristalinas, ya que se han visto cristalinas en ratones afáquicos y anoftálmicos.

Existen cambios en la producción de cristalinas a lo largo del proceso de desarrollo de las fibras cristaliniánas, por modificaciones en la expresión genética. Así, en embrión de pollo se ve una especialización máxima de las fibras en la formación de δ cristalina (las células ecuatoriales y centrales producen menos). En las fibras cristaliniánas de embriones de otras especies se acumula γ (bovino, de rata y de anfibio) o β cristalina (rata).

Se supone que la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) existente en las células puede influir en la síntesis de una cristalina. La acumulación parece depender de la estabilización del mRNA. Sin embargo, se ha visto que cantidades equivalentes de mRNA producen distinta cantidad de cristalinas; ésto se debería a cambios estructurales del mRNA, cambios en los niveles de factores de iniciación o competición ribosomal por mRNA de proteínas no cristalinas (Piatigorsky 1981)¹³.

Además de aumentar la síntesis de cristalinas en las fibras, hay disminución de la síntesis de proteínas no cristalinas (Piatigorsky 1981)¹³.

III. CLASES DE PROTEÍNAS CRISTALINAS

1. Composición química del cristalino

El cristalino es uno de los tejidos del cuerpo humano con menos proporción de agua en su composición (66%). Aparte de agua, está compuesto por:

1. 1. Proteínas

En su proceso madurativo, las fibras cristalinas pierden sus organelas y se agrupan. El citoplasma celular constituye el 95% del volumen del cristalino; el otro 5% restante depende de las membranas celulares. El 95% de la luz que incide en el cristalino lo atraviesa; el resto, posiblemente por efecto de las membranas celulares, se refleja o difumina (Bettelheim et al. 1986)¹⁸. La concentración proteica del cristalino tiene que ser elevada para aumentar su índice de refracción; así, el 35% del peso húmedo y prácticamente todo el peso seco del cristalino es proteico (Zigler y Goosey 1981)¹⁹.

Las proteínas se sintetizan fundamentalmente en el epitelio cristalino y en las fibras más periféricas. A pesar de carecer de núcleo celular, se ha descrito la síntesis activa de proteínas en el núcleo del cristalino (Lieska et al. 1992)²⁰, aunque otros autores lo consideran insignificante (Groenen et al. 1994)²¹.

La mayor parte de las proteínas del cristalino son **proteínas cristalinas** (95%). Son proteínas termodinámicamente estables. Su función estructural se basa en que están empacadas de un modo estable y ordenado en las fibras cristalinas de tal modo que permitan que el cristalino sea un medio transparente (Delage y Tardieu 1983)²².

En los mamíferos, las proteínas cristalinas están codificadas por tres grupos de genes (α , β y γ), de tal modo que existen tres familias de productos derivados de genes (Jong y Hendriks 1986)²³:

- Familia de las α cristalinas.

- Superfamilia de las β y γ cristalinas:
 - ° Familia de las β cristalinas.
 - ° Familia de las γ cristalinas.

La **diversidad de cristalinas** (entre especies y durante el desarrollo) también se puede deber a una ambigüedad en la transcripción, el procesamiento del RNA y la traducción:

- Señales de adición poli-A atípicas.
- “Splicing” alternativo del mRNA (ej. Existe αA^{Ins} en ratas, que es una αA con la inserción de un péptido entre los residuos 63 y 64, codificado por un exón que se sitúa en un lugar que corresponde al primer intrón).
- Uso de dos codones de iniciación en un mismo mRNA.

Las cristalinas se han modificado muy lentamente en el **proceso evolutivo**, ya que la mayoría de los cambios de aminoácidos representan selectivamente una desventaja: un cambio en la secuencia de una cristalina acarrea fácilmente una pérdida de transparencia cristaliniana.

El origen evolutivo de las α cristalinas está ligado al de las proteínas pequeñas de choque térmico, mientras que el de las β cristalinas parece ligado a una proteína de cubierta de spora bacteriana (proteína S fijadora de calcio de *Myxococcus xanthus*).

La α cristalina pertenece a una superfamilia con la que comparte una conformación similar de las regiones homólogas y, se supone, un origen evolutivo común (Jong et al. 1988)²⁴:

- sHSP.
- Antígeno p40 del huevo de *Schistosoma mansoni*.
- Dos antígenos de superficie de *Mycobacterium*.
- Dos proteínas inducibles de 16 kDa de *Escherichia coli*.
- Proteína de 21 kDa de *Stigmatella aurantica*.
- Proteína muscular de 29 kDa de *Halocynthia roretzi*.

Además de las proteínas cristalinas existen en el cristalino **proteínas citoesqueléticas, de membrana y enzimas.**

Se encuentran las siguientes proteínas de membrana en el cristalino (Berman 1991)²⁵:

- MP17-19. Proteína de membrana fijadora de calmodulina
- MP19-20. Proteína intrínseca de membrana.
- MP26 (forma las “gap-junctions”, constituye el 50% de las proteínas de membrana y se considera un indicador de la diferenciación de las fibras). La MP22 es un producto de fragmentación de ésta.
- MP33 y MP35. Proteínas extraíbles con EDTA.
- MP37. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
- MP53. Transportador de glucosa.
- MP70. Proteína intrínseca relacionada con la unión intercelular. La MP64 está íntimamente relacionada con ésta. La MP38 es un producto de clivaje de la MP70 y la MP64.
- MP90-107. ATPasa de sodio-potasio.
- MP115. Proteína intrínseca de membrana.
- MP130 y MP140. Glicoproteínas.
- MP200 (espectrina).

Las proteínas del citoesqueleto son la MP45 (actina) y la MP55 (vimentina).

1. 2. Azúcares

En el cristalino humano se ha comprobado el contenido de los siguientes azúcares (Cheng 1981)²⁶:

- Glucosa: 0'61 $\mu\text{mol/g}$
- Glucosa 6P: 0'3 $\mu\text{mol/g}$
- Fructosa 6P: 0'41 $\mu\text{mol/g}$

- Fructosa 1,6 DP: 0'03 $\mu\text{mol/g}$
- Triosas y tetrasas P: 0'7 $\mu\text{mol/g}$

La glucosa es la fuente energética fundamental del cristalino, al que llega a través del humor acuoso. Penetra mediante un sistema de transporte pasivo facilitado, insulino-dependiente, estereoespecífico para D-glucosa (Okuda et al. 1987)²⁷. La glucólisis proporciona dos tercios de la energía, mientras que el ciclo de Krebs (que no ocurre en las fibras cristalinas, por carecer de mitocondrias) proporciona el resto. Parte de la glucosa se degrada por la vía de las pentosas-fosfato. Además, hace más de cuarenta años se describió la vía del sorbitol en el cristalino (Heyningen 1959)²⁸.

1. 3. Lípidos

Se encuentran principalmente en las membranas celulares, en las cuales son tan abundantes como las proteínas. El 50-60% de los lípidos es colesterol (Zelenka 1984)²⁹. Además hay fosfolípidos (de éstos, hay un 47-56 % de esfingomielina, 9-18 % de fosfatidiletanolamina, 6-15 % de fosfatidilserina, 2-5 % de fosfatidilcolina y 1-4 % de fosfatidilinositol), con abundancia de ácidos grasos saturados (palmitato) y monoin-saturados.

El alto contenido de esfingomielina, colesterol y ácidos grasos saturados en las membranas celulares de las fibras cristalinas hace que éstas sean muy rígidas. A más colesterol, más rigidez; como existe un contenido en colesterol mayor en el núcleo que en la corteza, el núcleo tiene unas membranas celulares más rígidas (Alcala et al. 1985)³⁰.

1. 4. Solutos de bajo peso molecular

En el cristalino humano se encuentra ácido ascórbico (300 $\mu\text{g/g}$), con acción antioxidante, si bien puede ser prooxidante bajo determinadas circunstancias (Wolff et al. 1987)³¹, urea (4'7 $\mu\text{g/g}$), glutatión (1'43 $\mu\text{g/g}$), potasio, sodio y calcio.

Los aminoácidos más abundantes en el cristalino humano, ordenados decrecientemente según la cantidad de $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo, son (Berman 1991)²⁵:

- Glutámico: 3'42.
- Alanina: 1'34.
- Taurina: 0'79.
- Serina: 0'56.
- Prolina: 0'16.

2. Familia de las proteínas α cristalinas

La α cristalina fue aislada por primera vez, hace un siglo, en cristalino bovino (Mörner 1894)³². Existe en todos los vertebrados y, en humanos, es la proteína más abundante del cristalino. Fue reclutada en el proceso evolutivo para constituir el cristalino permitiendo que éste sea una estructura transparente.

La familia de las α cristalinas es muy estable. Su secuencia se ha conservado considerablemente en el proceso evolutivo y tiene un recambio (*turnover*) bajo. No se desnaturaliza hasta los 100 °C (no se alteran sus estructuras secundaria y terciaria). Los puntos isoeléctricos de las α cristalinas varían entre 4'8 y 5.

Dentro de esta familia proteica existen dos productos génicos principales. Estas **subunidades** tienen un peso molecular, cada una, de 20 kDa. Se denominan **αA** y **αB** cristalina. Las formas nativas son la αA_2 y la αB_2 , siendo la αA_1 y la αB_1 formas modificadas postraduccionalmente.

El gen de la αA cristalina se sitúa en el cromosoma 21 (Quax-Jeuken 1985)³³, mientras que el de la αB lo está en el 11 (Ngo 1989)³⁴. Probablemente, ambos genes provengan de una duplicación de un primitivo gen común (Wistow y Piatigorsky 1988)³⁵.

Los dos genes contienen dos intrones en lugares homólogos; el primer intrón coincide con el intrón del gen de la proteína pequeña de choque térmico de *Caenorhabditis elegans*; el segundo coincide con el intrón del gen de la proteína muscular de *Halocynthia roretzi*.

La relación normal del contenido cristaliniano de ambas subunidades es de 3 a 1 como referencia, variando con la edad y según la especie. Presenta un alto grado de homología entre ambas (57%). Sus estructuras secundaria y terciaria son similares.

La α A cristalina es ácida y está formada por 173 aminoácidos; por otra parte, la α B cristalina es más básica y está formada por 175 aminoácidos. La α A cristalina se biosintetiza principalmente en las fibras cristalinianas, mientras que la α B en el epitelio.

En la rata existe α A y α B cristalina pero, además, existe un producto génico denominado αA^{Ins} cristalina (antes llamada αX cristalina). Consiste en una $\alpha A2$ cristalina con una inserción de 22 residuos entre las posiciones 63 y 64 (Cohen 1978)³⁶.

La estructura secundaria de las distintas α cristalinas es similar, siendo lámina β el 95% y sólo un 5% hélice α).

3. Familia de las proteínas β cristalinas

Al igual que la familia de las α , la familia de las β cristalinas se halla presente en todos los vertebrados. Podría haber existido un gen primitivo común para la superfamilia de las β y γ cristalinas (Piatigorsky 1987)¹. En el cristalino bovino se describen los siguientes productos génicos:

- Proteínas β cristalinas básicas: $\beta B1$, $\beta B2$ y $\beta B3$.
- Proteínas β cristalinas ácidas: $\beta A1/\beta A3$, $\beta A2$ y $\beta A4$.

El peso molecular de los monómeros está comprendido entre 23-35 kDa. Su punto isoelectrico varía entre 5'7 y 7. Su estructura secundaria es lámina β .

4. Familia de las proteínas γ cristalinas

Esta familia proteica se da en todos los vertebrados, salvo aves y reptiles. Abunda en el núcleo del cristalino. Se distinguen los siguientes productos génicos (Hay 1994)³⁷:

- γ S (γ I).
- γ A (γ IVb).
- γ B (γ II).
- γ C (γ IIIa).
- γ D (γ IIIb).
- γ E (γ IVa).

De estos seis miembros de la familia de las γ cristalinas, dos no se expresan en humanos: γ A y γ E cristalina. Cada monómero tiene un peso molecular de 20 kDa. Su secuencia tiene Cys y aminoácidos aromáticos, que podrían proteger el cristalino de radiaciones ultravioletas y otros agentes externos. Su punto isoelectrico varía entre 7'1 y 8'1. Su estructura secundaria es lámina β .

La γ S cristalina es la proteína más abundante de la familia de las γ cristalinas. Era denominada β S cristalina, ya que se consideraba una β cristalinas, pero carece de extensión N-terminal, se presenta como monómero (como las γ cristalinas) y su secuencia se parece más a la de las γ cristalinas que a la de las β cristalinas. La secuencia completa de la γ S cristalina en el cristalino humano fue descrita recientemente, siendo su peso molecular exacto de 20'918 kDa (Smith 1995)³⁸. Sólo se expresa tras el nacimiento; por eso, a diferencia del resto de las γ cristalinas, sólo se expresa en la región cortical del cristalino (Slingsby y Clout 1999)³⁹.

5. Otras familias de cristalinas no humanas

Se han descrito numerosas familias de proteínas cristalinas en distintas especies y momentos del desarrollo (Jong y Hendriks 1986)²³:

La familia de las proteínas δ cristalinas existe en cristalinos de aves y reptiles, siendo principalmente embrionaria. Su peso molecular es de 48-50 kDa. Su punto isoeléctrico varía entre 4'9 y 5'3. Su estructura secundaria es hélice α en un 75% y, en un 25%, lámina β .

La proteína ε cristalina existe en algunas aves y reptiles, apareciendo tardíamente en el desarrollo. Su peso molecular es de 38 kDa; su punto isoeléctrico es de 7'5.

La proteína ρ cristalina existe en ranas. Su peso molecular es de 39 kDa; su punto isoeléctrico es de 8'5.

La familia de las proteínas τ cristalinas existe en algunos peces, aves y reptiles. Podría ser un ancestro de las δ cristalinas. Su peso molecular varía entre 46 y 48 kDa.

La familia de las S-III cristalinas ha sido descrita en el calamar.

IV. MODIFICACIONES DE LAS PROTEÍNAS CRISTALINAS

1. Insolubilización de las cristalinas

Debido a la falta de recambio de las proteínas cristalinas, éstas están sujetas a modificaciones postraduccionales diversas, las cuales pueden alterar la estructura cristaliniana y cambiar sus propiedades ópticas, produciendo cataratogénesis. El deterioro de la arquitectura del cristalino no conduce a la ceguera, pero sí a una pérdida de transparencia del mismo.

La cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography* o HPLC) es una técnica que puede aplicarse al fraccionamiento proteico. Mediante cromatografía, empleando columnas de filtración en gel, se distinguen las siguientes fracciones de alto (*high* o H) y bajo (*low* o L) peso molecular, según su elución sea más o menos rápida:

- α H: más de 1000 kDa.
- α L: 800 kDa.
- β H: 130 kDa.
- β L1: 57 kDa.
- β L2: 32 kDa.
- LMW (γ y γ S): 20 kDa.

Las proteínas del cristalino son predominantemente solubles en agua, pero pueden insolubilizarse con el tiempo. De este modo se diferencian dos fracciones proteicas principales:

- Fracción soluble en agua (*water soluble* o WS).
- Fracción insoluble en agua (*water insoluble* o WI). Esta fracción se subdivide en dos: fracción soluble en urea (WI-US) y fracción insoluble en urea (WI-UI).

Con la edad, se produce agregación de las proteínas cristalinas, que conduce a su insolubilización. Los agregados presentan distintas proporciones de todas las clases de cristalinas y, además, contienen péptidos de bajo peso molecular. Los agregados proteicos de alto peso molecular (*high molecular weight* o HMW) aumentan con la edad, particularmente en el núcleo del cristalino. Se distinguen los siguientes agregados proteicos de HMW:

- HMW-1.
- HMW-2 (WS-HMW).
- HMW-3 (WI-US-HMW). Agregado con puentes disulfuro.
- HMW-4 (WI-UI-HMW). Agregado con enlaces covalentes.

En la cataratogénesis, la formación de proteínas de la fracción WI aumenta, mientras que disminuye la de la fracción WS. Con la edad, independientemente de la formación de la catarata, hay un aumento de agregados de HMW, unidos por enlaces disulfuro en el primer caso o por enlaces no covalentes en el segundo (Spector 1984)⁴⁰.

2. Modificaciones postraduccionales de las cristalinas

2. 1. Desamidación, isomerización y racemización.

La desamidación desestabiliza las proteínas, haciéndolas más susceptibles a la degradación proteolítica. Se ha visto en numerosas especies. Ocurre mediante la formación de una estructura cíclica (succinimida). El Aspartato (Asp) alterado podría repararse mediante carboxil-metil-transferasa. En humanos se desamida la α A cristalina en la Asparagina (Asn), en el residuo Asn101 (Kramps et al. 1979)⁴¹.

La rotura del anillo de succinimida da lugar a isomerización y racemización; con la edad, se acumula D-Asp en el núcleo cristalino, proceso que se encuentra acelerado en las cataratas brunescientes (Zigler y Goosey 1981)¹⁹. En humanos ocurre en los residuos Asp36 y Asp62 de α B (Fujii et al. 1994)⁴².

2. 2. Truncación.

La truncación del extremo N-terminal de las cristalinas β A1, β A3 y β B1 es una de las modificaciones más importantes en la alteración significativa del peso molecular de las cristalinas. Puede verse en cristalinos humanos de menos de un año, aumentando con la edad (Ma et al. 1998)⁴³.

La α A cristalina puede sufrir una fragmentación en la zona C-terminal. Al perderse el extremo C-terminal se reduce la actividad caperona (Kelley et al. 1993)⁴⁴. Se produce una formación de un anillo succinimida, rompiéndose el enlace peptídico, siendo caso claro el de Asp151-Ala152. En cristalino bovino ocurre en residuos de triptófano (Trp), arginina (Arg), valina (Val), glutamato (Glu), prolina (Pro), serina (Ser), alanina (Ala), treonina (Thr) y lisina (Lys) (Siezen y Hoenders 1979)⁴⁵. La truncación de la α A cristalina bovina resulta en la formación de los siguientes polipéptidos: α A (1-172) (Emmons y Takemoto 1992)⁴⁶, α A (1-169), α A (1-168) (Jong et al. 1974)⁴⁷, α A (1-151) (Kleef et al. 1976a)⁴⁸, α A (1-101) (Kleef et al. 1976b)⁴⁹. La truncación de la α B cristalina bovina ocurre específicamente en Thr170-Ala171, apareciendo el polipéptido α B (1-170) (Kleef et al. 1976b)⁴⁹. Esta truncación puede llevarse a cabo mediante endopeptidasas o calpaína, la cual fragmenta la cadena α B bovina en Arg163 y Thr 170, y la α A en Ser162 y Arg 163 (Yoshida et al. 1986)⁵⁰.

Las calpaínas son proteasas neutras tipo cisteína, calcio-dependientes y no lisosomales. Se encuentran en casi todos los tejidos animales; se han detectado en el cristalino bovino, de rata, de ratón y humano (Andersson et al. 1994)⁵¹. La opacificación del cristalino se ha asociado a elevación del calcio cristalino (Chandrasekher y Cenedella 1993; David et al. 1993)^{52,53}. Se ha sugerido que la proteólisis de ciertas proteínas cristalinas pueda ser mediada por la calpaína II, que es una calpaína que requiere una concentración de más de 50 μ M de calcio para su activación.

Se ha demostrado la acción degradante de la calpaína II in vitro sobre las cristalinas α y β , y sobre las proteínas del citoesqueleto (Andersson et al. 1994)⁵¹. La γ

cristalina, sin embargo, parece resistente a la acción de la calpaína II (David et al. 1992)⁵⁴; su insolubilización podría deberse a interacciones con β cristalinas parcialmente degradadas (David et al. 1994)⁵⁵. La acción de la calpaína II sobre la α cristalina se produce sobre su porción C terminal, formando polipéptidos de 17-19'5 kDa (Yoshida et al. 1986)⁵⁰. Se ha observado que la acción de la calpaína II sobre las β cristalinas hace que sean parcialmente insolubles, por la separación de la extensión N o C terminal. Estos polipéptidos insolubles son similares a los formados in vivo durante la cataratogénesis (David et al. 1992)⁵⁴.

La acción de la calpaína no sólo se produce durante la cataratogénesis, sino que también existe en el envejecimiento normal del cristalino. Por ello se ha propuesto que la cataratogénesis debida a la acción de la calpaína II ocurre cuando la insolubilización que produce ocurre muy rápido (David et al. 1994)⁵⁵.

En humanos, la calpaína presente en el cristalino precisa para su activación concentraciones de calcio del orden de mM, por lo que se conoce como calpaína m (Andersson et al. 1994)⁵¹. La actividad de la calpaína m en el cristalino humano es menor en el núcleo que en el córtex; asimismo, disminuye su actividad con la edad (David et al. 1989)⁵⁶. La catarata cortical tiene niveles de calpaína m mayores que la nuclear, lo cual se ha atribuido a la influencia que tiene el epitelio cristalino dañado sobre las fibras adyacentes (Andersson et al. 1994)⁵¹.

La extrapolación de los datos existentes sobre la cataratogénesis atribuible a calpaína deben ser aún demostrados en humanos, ya que los polipéptidos resultantes de la acción de ésta son distintos a los encontrados durante el envejecimiento cristalino (David et al. 1994b)⁵⁷.

2. 3. Fosforilación.

Es reversible en el epitelio cristalino, pero no en las fibras cristalinas. Se ha visto, en cristalino bovino, en los siguientes residuos (Smith et al. 1992)⁵⁸:

- α A cristalina (in vivo e in vitro): Ser122.
- α B cristalina (in vivo): Ser19, Ser45 y Ser59.

De las β cristalinas, sólo uno de los polipéptidos (β B2) parece encontrarse fosforilado (Ser203) (Kleiman et al. 1988)⁵⁹.

Se han descrito dos vías para producirse la fosforilación de las proteínas del grupo de las α cristalinas:

- Vía dependiente de adenosín-monofosfato cíclico (cAMP) y de calcio (Ca^{+2})-calmodulina. Se fosforila un residuo de Ser en el lugar Arg-Xaa-Xaa-Ser (Spector et al. 1985)⁶⁰.
- Vía independiente de cAMP (autofosforilación de la α cristalina).

Se produce en presencia de magnesio (Mg^{+2}) y de ATP. Se ha demostrado que existe esta vía de fosforilación independiente de cAMP y que se trata de una autofosforilación de la α cristalina (Kantorow y Piatigorsky 1994)⁶¹. De este modo, se encuentra que la α cristalina puede funcionar como un enzima.

El 2% de la α se autofosforila (en presencia de NaCl 50mM; sin NaCl aumentaría el porcentaje). Según la autofosforilación de la α cristalina se distinguen (ver tabla 1):

α A cristalina	α B cristalina
α A: no fosforilada	α B: no fosforilada
α Ap: monofosforilada	α Bp: monofosforilada
	α Bp2: difosforilada

Tabla 1. Fosforilación de la α cristalina.

Se supone que existe un inhibidor de la autofosforilación en el cristalino, ya que la autofosforilación sólo se demuestra cuando las proteínas están purificadas.

El papel de la autofosforilación se desconoce. La autofosforilación ya se había demostrado en las proteínas de choque térmico grandes (DnaK, GroEL, HSP70, HSP90), teniendo significado en la replicación de DNA, la transcripción y la degradación proteica (Kantorow y Piatigorsky 1994)⁶¹.

El papel de la autofosforilación de α podría ser (Groenen et al. 1994)²¹:

- ° Como en GroEL y DnaK: regulación de la unión de α cristalina con otras proteínas (esto sería importante en la actividad caperona).
- ° Como en HSP70: agregación de la α cristalina consigo misma.

2. 4. Glicosilación.

Se producen modificaciones con enlace O-N-acetilglucosamina (Roquemore et al. 1992)⁶². En la α A cristalina bovina ocurre en Ser162, mientras que en la α B bovina ocurre en Thr158 y Thr162.

2. 5. Glicación.

La glicación proteica (tanto con puentes disulfuro como con otros enlaces covalentes) se relaciona con la aparición de catarata senil y catarata diabética. Las cristalinas forman enlaces covalentes con glucosa y otras aldosas (vía reacción de Maillard). El grupo aldehído del azúcar reacciona con el grupo ϵ -amino de Lys o el α -amino de una proteína, para formar una base de Schiff reversible, que acaba formando una estructura cetoamina estable (producto de Amidori; ver figura 1) (Perry et al. 1987)⁶³.

La glicación puede inhibirse mediante aminoguanidina y NaCNBH₃.

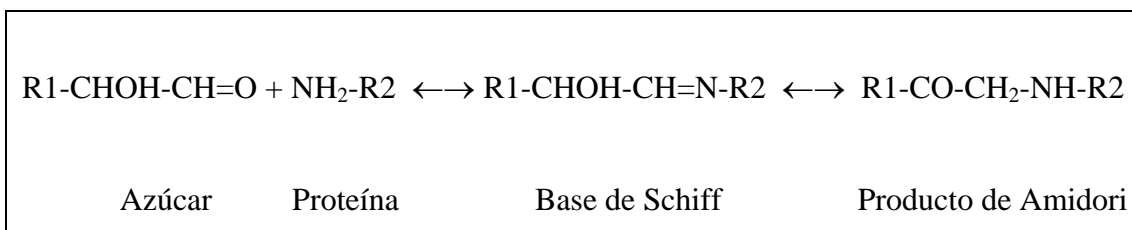


Figura 1. Glicación proteica.

Al incubar, in vitro, αA y αB cristalinas bovinas con ascórbico, se observa glicación en todos los residuos de Lys (Ortwerth et al. 1992)⁶⁴.

La glicación de las cristalinas (mediante azúcares o azúcares-fosfato) produce en éstas lo siguiente (Swamy y Abraham 1987)⁶⁵:

- Cambio de conformación.
- Aumento de la susceptibilidad de oxidación de grupos sulfidrilo, resultando en la formación de agregados de HMW.
- Coloración marrón.

Al incubar cristalinas bovinas con azúcares ocurre lo siguiente (Swamy et al. 1993)⁶⁶:

- Con azúcares poco reactivos (glucosa): se forman agregados proteicos con puentes disulfuro.
- Con azúcares más reactivos (eritrosa): se forman agregados proteicos insolubles de alto peso molecular con enlaces covalentes no disulfuro. Los productos formados son de glicación avanzada (son hiperfluorescentes y tienen capacidad de producir enlaces cruzados con proteínas).

Si aumentan los azúcares en el cristalino se favorecen los enlaces cruzados con las cristalinas; la aparición de cambios proteicos y agregados disminuye la transparencia del cristalino.

2. 6. Carbamilación.

El grupo ϵ -amino de Lys o el α -amino de una proteína reacciona con isocianato (componente endógeno del cristalino en equilibrio con urea). Si aumenta el isocianato en sangre (diarrea, fallo renal) puede acelerarse la cataratogénesis. Se ha visto carbamilación de todos los residuos de Lys de α A bovina in vitro (Qin et al. 1992)⁶⁷.

2. 7. Acetilación.

Ocurre en el residuo N-terminal o en el grupo ϵ -amino de Lys. La aspirina inhibe la glicación y la carbamilación de las cristalinas, posiblemente mediante la acetilación de los residuos de Lys, pero no parece inhibir, in vivo, la cataratogénesis (Hasan et al. 1993)⁶⁸.

2. 8. Transglutaminación.

Ocurre en las β cristalinas. La transglutaminasa cataliza una reacción calcio-dependiente en la que reaccionan un grupo γ -carboxamida de un residuo de Gln (receptor de aminos) con un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys (donante de aminos), para formar un enlace cruzado γ -glutamil- ϵ -lisina. La transglutaminasa se ha relacionado, entre otros procesos, con la cataratogénesis.

En el cristalino bovino son receptores de aminos las cristalinas β B2, β B3 y β A3. Los donantes son α B, β B1, β A3 y β A4. El hecho de que sólo uno de los nueve residuos Lys de la β A3 bovina sea donante de aminos indica que los sustratos deben situarse en lugares accesibles de las cristalinas (Groenen et al. 1994b)⁶⁹.

2. 9. Oxidación y coloración del cristalino.

La oxidación de las cristalinas puede acelerar la cataratogénesis. La afectación de aminoácidos específicos produce alteraciones de carga, degradación proteica, enlaces cruzados proteicos e insolubilización. Estos cambios suceden por fotooxidación o por radicales libres de oxígeno (RLO), afectándose los residuos de Trp, His, Tyr, Cys, Met y Phe. El cristalino trata de protegerse mediante compuestos y enzimas antioxidantes.

Con la edad, el cristalino va adquiriendo una coloración amarillenta-marrón, debida a los cromóforos asociados con las cristalinas, sobre todo en el núcleo del cristalino. El pigmento se compone, al menos en parte, de productos oxidativos de los compuestos aromáticos del cristalino, principalmente Trp. El aumento de la pigmentación se asocia con un aumento de la absorción, por parte de las proteínas cristalinas, de la radiación con longitud de onda de 300-500 nm, y una disminución de la percepción de luz violeta y azul por parte del paciente (Hood et al. 1999)⁷⁰.

Asimismo, se produce un aumento de una fluorescencia inusual para las proteínas, con una excitación a 315-360 nm y una emisión a 400-440 nm, denominada “fluorescencia no-triptófano”. Esta fluorescencia se atribuye a kinureninas, ácido antranílico, hidroxiquinolininas y bitirosina, compuestos que aparecen por la oxidación de los residuos aromáticos Trp y Tyr (Kanwar y Balasubramanian 1999)⁷¹.

La formación de enlaces bitirosina se produce mediante la unión carbono-carbono entre dos residuos de Tyr. Puede ser intra o intermolecular, conduciendo ésta a la formación de productos de alto peso molecular. De las familias de cristalinas, la γ es la que más frecuentemente presenta enlaces bitirosina, posiblemente debido al alto contenido en residuos de Tyr (Kanwar y Balasubramanian 1999)⁷¹. Los niveles de bitirosinas aumentan más rápidamente cuando se forma una catarata nuclear (Fu et al. 1998)⁷².

Los filtros de radiación UV, como el glucósido del ácido 4-(2-amino-3-hidroxifenil)-4-cetobutanoico (AHBG), la kinurenina, la 3-hidroxi-kinurenina (3-OHK) y el O- β -D-glucósido de la 3-hidroxi-kinurenina (3-OHKG), parecen jugar un papel

protector frente al que provoca el daño creado por esta radiación en el cristalino y la retina. Sin embargo, bajo determinadas condiciones, los filtros pueden unirse covalentemente a las cristalinas y modificarlas, con aumento de la coloración del cristalino (Hood et al. 1999)⁷⁰, por lo que podrían ser considerados fluoróforos. Parece ser que la unión de GSH y de 3-OHKG es un fluoróforo que se forma en el cristalino añoso; el 3-OHKG y el AHBG disminuyen ligeramente con la edad o permanecen constantes, mientras que el GSH-3-OHKG aumenta (Garner et al. 1999)⁷³. Se ha sugerido que la unión de las cristalinas con los fluoróforos precisa de un daño oxidativo previo (Hood et al. 1999)⁷⁰.

3. Oxidación ocular

3. 1. Estrés oxidativo en el ojo

El ojo está expuesto a las radiaciones solares, oxígeno y diversas sustancias químicas integrantes de la polución atmosférica. Debido al envejecimiento de la población en nuestro medio y a la reducción de la capa de ozono (aumentarán la exposición a radiaciones solares) este tema ha suscitado gran interés (Rose et al. 1988)⁷⁴. El daño oxidativo de las cristalinas produce enlaces cruzados proteicos, agregados de alto peso molecular y disminución de la solubilidad, conduciendo todo ello a la cataratogénesis. El daño se produce cuando aumenta el estrés oxidativo o disminuyen los factores protectores.

Los oxidantes oculares son H_2O_2 , O_2 y los fotosensibilizantes, como Trp, NAD^+ y riboflavina. Las fuentes de RLO en el ojo son las siguientes:

- Radiación solar.
- Respiración mitocondrial, con la reducción de O_2 a H_2O .
- Producción de H_2O en distintas reacciones metabólicas intra y extracelulares.

Son considerados protectores oculares los compuestos siguientes:

- Hidrosolubles: Vitamina C, Cys, Tyr, glutatión, úrico y piruvato.
- Liposolubles: tocoferol y retinol.
- Enzimas: superóxido-dismutasa (SOD), catalasa y glutatión-peroxidasa.
- Proteínas fijadoras de metales: transferrina, ceruloplasmina y albúmina.

3. 2. Efecto de las radiaciones

El estrés fotoquímico es uno de los principales factores envueltos en la cataratogénesis. La córnea detiene la radiación ambiental de longitud de onda menor de 295 nm, absorbiendo el cristalino la mayor parte de la de 295-400 nm (Berman 1991)²⁵.

Un fotón puede arrancar un electrón a una molécula y hacer que aparezca un RLO. Después de aparecer un RLO, éste puede pasar su electrón desapareado a otras moléculas, apareciendo una cascada de reacciones que altera las membranas celulares cristalinianas (Varma et al. 1979)⁷⁵, lo cual conlleva una pérdida de su función de transporte. Esto va asociado a un descenso en la concentración de ATP, un cambio en las concentraciones iónicas, una oxidación del glutatión, un inicio en la oxidación proteica en el citoplasma celular, una disminución de la síntesis proteica y un aumento del metabolismo de la glucosa. Estos cambios acaban desembocando en la formación de agregados proteicos mediante enlaces disulfuro, rotura de las membranas celulares y formación de catarata (Spector 1984)⁴⁰.

La riboflavina y la radiación luminosa estimulan los fenómenos oxidativos y la aparición de radicales ascorbil-semiquinona; éstos afectan in vitro al epitelio cristaliniano, pudiéndose inhibir su efecto mediante SOD, catalasa y albúmina (Wolff et al. 1987)³¹.

Los productos oxidativos del ascórbico producen glicación proteica y aparición de productos de glicación avanzada que pueden absorber radiaciones UVA. Se produce una oxidación fotolítica de las proteínas, supuestamente mediada por RLO. Se ha sugerido que la gran cantidad de ascórbico existente en el acuoso protege de esta oxidación a las estructuras oculares que hay tras él (Ringvold 1996)⁷⁶.

3. 3. Efecto del oxígeno

En presencia de trazas de metales de transición libre y fotosensibilizantes el ascórbico reacciona con oxígeno para formar peróxido de hidrógeno. Éste podría dañar la membrana de las células cristalinas y las proteínas cristalinas (Yugay et al. 1996)⁷⁷.

3. 4. Efecto del peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un componente normal del humor acuoso; es un RLO y participa en la formación de otros RLO. Se suele aceptar que los cambios en la concentración de H_2O_2 en acuoso se relacionan con la cataratogénesis asociada a la edad (García Castineiras 1992)⁷⁸, sin embargo, otros autores encuentran lo contrario (Sharma et al 1997)⁷⁹.

Se puede formar H_2O_2 in vitro en presencia ascorbato (debido a esto, se ha propuesto que, en determinadas circunstancias, el ascorbato pueda ser un prooxidante in vivo y servir como fuente de H_2O_2), riboflavina y luz, o metales. Mediante un sistema oxidativo catalizado por metal, peróxido de hidrógeno / ión cobre (H_2O_2/Cu^{2+} ; sistema MCO), que genera radicales hidroxilo al actuar sobre proteínas cristalinas hidrosolubles puede demostrarse proteolisis, polimerización proteica, formación de bitirosinas y pérdida de Trp; la acción del sistema se inhibe mediante Cys (1mM) y se modifica por la presencia de aminoácidos libres en el medio (Suárez-Sanz et al. 1996b)⁸⁰. La formación de grupos carbonilo en las proteínas es un indicador de la modificación por el sistema MCO y del envejecimiento (Garland et al. 1988)⁸¹.

El epitelio cristalino es un potente degradante de H_2O_2 in vitro (Giblin et al. 1990)⁸²; utiliza catalasa y glutation-peroxidasa, que funcionan a la vez.

3. 5. Prooxidantes en el ojo

El superóxido puede reducir hierro a estado ferroso y éste reaccionar con H_2O_2 para formar radical hidroxilo.

El radical hidroxilo se forma, en el cristalino, por fotosensibilización o por efecto Fenton. Puede alterar los residuos de Trp, His, Met y Cys (Garland et al. 1986)⁸³. Por otra parte, se ha visto, en proteína BSA, que se podían alterar también Asp, Asn, Glu, Gln y Lys. Todas estas alteraciones inducen la agregación proteica, sobre todo mediante la formación de enlaces no disulfuro (Davies 1987, Davies et al. 1987, Davies et al. 1987b, Davies et al. 1987c)⁸⁴⁻⁸⁷.

El efecto del radical hidroxilo en los diferentes residuos es el siguiente:

- Triptófano. Se forma N-formil-kinurenina, pero no induce agregación proteica.
- Tirosina. Induce la formación de DOPA en mucha más proporción que la de bitirosina. Los niveles de DOPA parecen ser los responsables de la coloración de las cataratas nigrae (Fu et al. 1998)⁷².
- Histidina. Su afectación parece necesaria para que aparezca agregación. Su protección (mediante dietil-pirocarbonato) inhibe la aparición de enlaces cruzados.
- Lisina. Su alteración también parece intervenir en la agregación, ya que su protección (por maleilación) también inhibe los enlaces cruzados.

Las proteínas oxidadas son más ácidas y pueden tener alteradas ciertas características conformacionales. Las familias de cristalinas más afectadas son la α y la δ , seguidas por la β ; la menos afectada es la γ . En la δ cristalina se ve aumento de Glx y Asx, y descenso de His y Arg.

La catarata nuclear es la más relacionada con el ataque del radical hidroxilo sobre las cristalinas (Fu et al. 1998)⁷².

3. 6. Mecanismos de protección

Al incubar cristalinos cataratosos humanos con membranas liposomales, se produce una disminución en la actividad de glutatión-peroxidasa y un aumento de dienos conjugados y sustancias TBA-reactivas (Babizhayev 1996)⁸⁸. Estos productos oxidativos ven disminuida su formación en presencia de los protectores EDTA, SOD, catalasa y hierro quelado.

El piruvato parece ser un protector del cristalino (Varma y Devamanoharan 1995b)⁸⁹. Su presencia minimiza la generación de carbonilos inducidos por el daño en las proteínas cristalinas por los RLO (sobre todo por el radical hidroxilo). Por otra parte, la adición de piruvato aumenta el *shunt* de las hexosas-monofosfato, que protege del daño producido por estrés oxidativo. Se supone que la estimulación del *shunt* se debe a la formación de NADP (piruvato+NADPH+H⁺ → lactato+NADP), que actúa como cosustrato en las primeras reacciones formándose NADPH, que puede reducir el GSSG. Ya que el piruvato es un metabolito glucolítico que tiene efecto antioxidante, se entiende que se precisa un metabolismo normal del cristalino para mantener su transparencia. Posiblemente, con la edad, haya disminución de piruvato debido a la disminución de la glucolisis.

Se considera que el ascórbico, cuya concentración intraocular es elevada, es un sustrato primario de la protección ocular. Parece ser que el mecanismo de acción del ascorbato en el ojo es degradar H₂O₂ y consumir oxígeno, por lo que, en condiciones normales, no sería un prooxidante sino un antioxidante.

El ascórbico puede aumentar la ferritina en las células del epitelio cristalino, produciendo un efecto protector; por otra parte, el defecto de la síntesis de ferritina es una anomalía de herencia dominante que cursa con catarata bilateral precoz (Goralka et al. 1997)⁹⁰.

Se ha visto que el dehidroascorbato (DHAA) protege al cristalino de ratas frente al estrés oxidativo y la cataratogénesis *in vitro* (Varma y Devamanoharan 1995)⁹¹. Estos

efectos podrían deberse al ascorbato, que resulta de la reducción de DHAA (Bendich et al. 1995)⁹².

3. 7. Papel del metabolismo ocular de la vitamina C

Los productos del metabolismo y degradación del ascorbato se han relacionado con la cataratogénesis (Giangiacoimo et al. 1996)⁹³.

La tioltransferasa, el ascorbato, el GSH y la glutathion reductasa se relacionan con la protección del cristalino contra el daño oxidativo (ver figura 2). La semi-DHAA reductasa está en el córtex cristalino pero pierde actividad en el cristalino cataratoso (Bando y Obazawa 1990)⁹⁴.

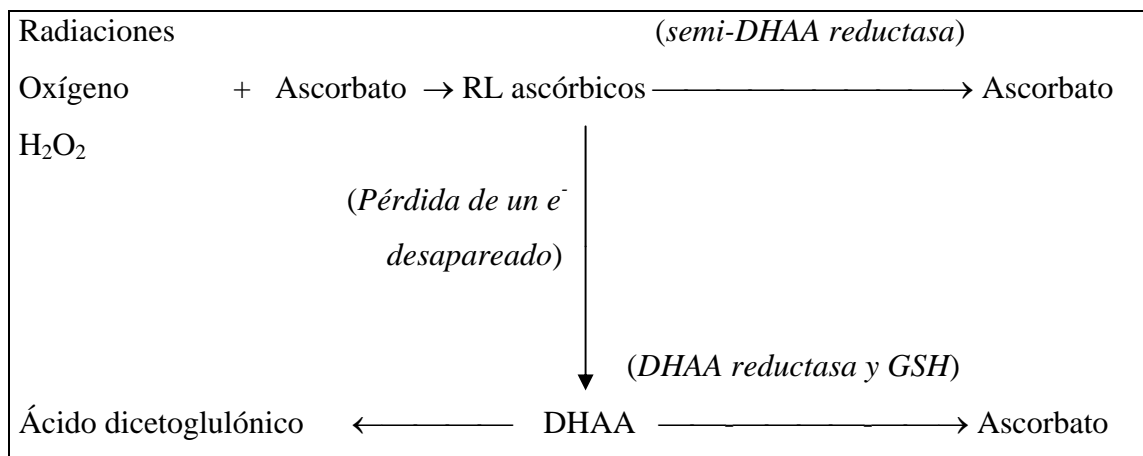


Figura 2. Metabolismo del ascorbato.

3. 8. Importancia del glutathion

Todas las enzimas requeridas para la síntesis y la degradación de GSH han sido detectados en el cristalino. Los niveles de GSH son elevados en el cristalino, pero disminuyen con la edad y, sobre todo, con la aparición de la mayoría de las formas de

catarata (Kasuya et al. 1992)⁹⁵. El núcleo cristalino, que tiene niveles más bajos de GSH que el córtex, parece más susceptible al daño oxidativo (Berman 1991)²⁵.

La glutatión peroxidasa cataliza la descomposición de H₂O₂ en presencia de GSH. Se produce glutatión oxidado (GSSG), resintetizándose el GSH a partir del NADPH, el cual se genera principalmente a partir de la vía de las pentosas-fosfato (Berman 1991)²⁵.

Tanto el acetil-tioéster como el etil-éster pueden aumentar el GSH (Nagasawa et al. 1996)⁹⁶.

V. FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS CRISTALINAS

1. Función estructural de las cristalinas

En el proceso evolutivo, muchas de las cristalinas de los vertebrados fueron “reclutadas” a partir de enzimas ya existentes para ejercer un papel adicional, como proteínas estructurales (Wistow y Piatigorsky 1987)¹.

Clásicamente, la única función atribuida a las proteínas cristalinas ha sido la **función estructural**, permitiendo la transparencia y correcto índice de refracción.

2. Estructura de la α cristalina

Las **estructuras terciaria y cuaternaria de las α cristalinas** no se conoce perfectamente porque, a pesar de los esfuerzos realizados, no se ha conseguido cristalizar. Las α cristalinas dan lugar a complejos multiméricos heterogéneos de peso molecular comprendido entre 300 y más de 1000 kDa (Groenen et al. 1994)²¹. Se compone de las subunidades o productos génicos αA y αB (cuyo peso molecular es de 20 kDa), y de productos derivados de modificaciones postraduccionales. Cada complejo de α cristalina consta de unas 35 a 45 subunidades, existiendo 3 subunidades αA por cada subunidad αB . El motivo por el que existe esta relación 3:1 es porque ésta es la combinación más estable termodinámicamente, modificándose su estructura secundaria sólo en un 10% al elevar experimentalmente la temperatura desde 25 hasta 50 °C (Horwitz et al. 1999)⁹⁷.

La **estructura secundaria** de la α cristalina incluye mucha lámina β y poca hélice α .

En la **estructura terciaria** de la α cristalina se distinguen dos dominios (Wistow 1985)⁹⁸:

- Dominio N-terminal, formado a partir de un exón.
- Dominio C-terminal (con un brazo C-terminal expuesto), formado a partir de dos exones.

La **estructura cuaternaria** de la α cristalina es objeto de controversia. Así, se ha sugerido que podrían existir más de 1000 híbridos distintos de α cristalina (Siezen et al. 1979)⁴⁵, siendo las modificaciones postraduccionales un factor importante en la heterogeneidad. Se han propuesto numerosos modelos de estructura cuaternaria:

a) Modelo de tres capas (Bindels et al. 1979)⁹⁹. La capa interna estaría formada por αA , mientras que las otras dos capas lo están por αA y αB . Las dos capas más externas estarían incompletas, para que fueran añadiéndose subunidades de αA y αB con la edad. Este modelo fue mejorado más tarde, confirmándose que la subunidad αA está en las tres capas (Siezen et al. 1980)¹⁰⁰.

b) Modelo micelar (Augusteyn y Koretz 1987)¹⁰¹. Propone que la α cristalina se comporta como una proteína micelar, es decir, con la zona hidrófoba situada centralmente confiriendo estabilidad.

c) Modelo de la “ αc cristalina” (Walsh et al. 1991)¹⁰². Propone un modelo de tres capas, que representa a una proteína inestable termodinámicamente denominada αc (aumentando la temperatura del medio de modo no fisiológico, demuestra la aparición de pequeños oligómeros más termoestables, a los que denomina αm). La αc cristalina tendría un total de hasta 42 subunidades y un peso de unos 800 kDa:

- Capa interna (12 subunidades). Es micelar. Su simetría es cuboctaédrica. Deja espacio a 6 subunidades más.
- Capa media (6 subunidades). Completa la estructura micelar de la capa interna (sus zonas hidrófobas se orientan hacia la región más interna). Tiene simetría octaédrica.
- Capa externa (hasta 24 subunidades). Los contactos entre subunidades son principalmente polar-polar; parte de la cara hidrofóbica de cada subunidad

tiende a estar hacia el interior de una estructura trimérica y el resto de la cara hidrofóbica hacia fuera y en la superficie de la capa externa. La unión de las subunidades es lábil (se separan con calor o urea), confirmando la disminución de peso molecular de la α cristalina que se había observado previamente al exponerla al calor (Tardieu et al. 1986)¹⁰³.

d) Modelo de las dos isoformas (Wistow 1993)¹⁰⁴. Propone dos isoformas posibles: cubo de seis caras (24 subunidades) y dodecaedro rómbico de 12 caras (48 subunidades). En cada cara habría 4 dominios C-terminal de 4 subunidades; los dominios N-terminal se situarían en el interior. Recientemente se ha sugerido una conformación variable y dinámica para la α cristalina (Horwitz et al. 1999)⁹⁷.

3. Estructura de las cristalinas β y γ

La secuencia de la familia de las β cristalinas tiene un 30% de homología con la de la familia de las γ . Los miembros la superfamilia de las β y γ cristalinas se pliegan creando dos dominios, cada uno de los cuales se pliega en dos motivos con forma de grecas. Cada una de estos motivos consiste en 40 residuos de aminoácidos, que se pliegan en cuatro hebras consecutivas antiparalelas, denominadas a, b, c y d (Slingsby y Clout 1999)³⁹.

Las distintas β cristalinas se diferencian de las γ cristalinas en que aquellas tienen largas extensiones N-terminales (Jong et al. 1994)¹⁰⁵.

La β cristalina predominante es la β B2. Forma un homodímero β B2- β B2 en solución y un tetrámero cristalizada cuando se mezclan soluciones de β B2 y β B3. Se forman heterodímeros β B2- β B3 a partir de homodímeros β B2- β B2 y β B3- β B3 (Slingsby 1994)¹⁰⁶. El heterodímero es termodinámicamente más favorable que los homodímeros. Se supone que, aunque parezca que sólo hay dímeros en solución, habría también niveles significativos de monómeros y en equilibrio con los dímeros.

Se han propuesto diferentes hipótesis de asociación de las β cristalinas, basadas en interacciones dímero-tetrámero y tetrámero-tetrámero (Slingsby et al. 1997)¹⁰⁷.

Los dominios de las γ cristalinas de una misma cadena interactúan entre sí de modo simétrico, dejando entre ambos un conjunto de residuos hidrofóbicos.

4. Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico o HSP (*heat shock proteins*) son proteínas producidas por inducción de determinados genes mediante choque térmico y otras situaciones de estrés.

Según su peso molecular, se distinguen las siguientes HSP:

- HSP pequeñas o *small HSP* (sHSP). Familia de 15-30 kDa. Hay organismos con sólo un tipo de sHSP (pollo, levadura) y otros con hasta treinta (plantas). Forman agregados denominados Gránulos de Choque Térmico. Se supone que participan en interacciones proteína-proteína y en la termotolerancia adquirida.
- HSP 60, HSP 70 y HSP 90. Son caperonas moleculares que ayudan en el plegado y translocación de polipéptidos.

La región promotora de las sHSP tiene un Elemento de Choque Térmico o *Heat Shock Element* (HSE). A elevadas temperaturas (o ante determinadas fases del desarrollo, como se ha visto en *D. melanogaster*), un Factor de Choque Térmico o *Heat Shock Factor* (HSF) se une al HSE, activando la transcripción. La región promotora que participa en la activación de la transcripción por calor es completamente distinta a la que participa en la activación en otras fases del desarrollo. El HSE tiene, al menos, tres unidades de 5 pares de bases (pb) que alternan NGAAN y NTTCN. En la región promotora de la α B cristalina hay una unidad de 5 pb entre las posiciones -39 y -53, y

dos entre la -376 y la -385. El HSF es un trímero. Se supone que cada monómero se une a cada unidad de 5 pb del HSE.

En situaciones de estrés los agregados que forman las sHSP son mayores, y las proteínas pasan del citoplasma al núcleo o zona perinuclear; con la recuperación de la situación basal vuelven al citoplasma.

5. La familia de las α cristalinas como sHSP

En 1982, se describió la existencia de una notable homología de las α cristalinas con las sHSP (Ingolia y Craig 1982)¹⁰⁸.

Casi diez años más tarde se demostró que **la α B cristalina es una sHSP** (Klemenz et al. 1991)¹⁰⁹. Para ello, se demostró cómo se acumula α B cristalina en las células de ratón NIH3T3 sometidas a hipertermia u otras situaciones de estrés. Las conclusiones a las que se llegó fueron:

- La α B cristalina se acumula bajo situaciones de estrés.
- La α B cristalina y las proteínas inmunorreactivas de células tratadas con choque térmico comigran, sugiriendo que son la misma sustancia.
- La α B cristalina forma partículas de 17 S en fibroblastos.
- La función del promotor de la α B cristalina se activa por calor.

Se supone que la α cristalina, al tener función de caperona, ve estabilizada su estructura durante años, evitando la necesidad de un recambio (las cristalinas formadas se van acumulando en el cristalino pero no se renuevan) y permitiendo tolerar el estrés (Groenen et al. 1994)²¹. Además, las propiedades físicas de la α B cristalina permiten que pueda formar agregados ordenados y que éstos sean transparentes.

Parece ser que es el conjunto de 100 residuos situados en el extremo C-terminal de la α cristalina la zona más homóloga con las sHSP (Slingsby y Clout 1999)³⁹.

El choque térmico induce la expresión de la α B cristalina en células como las NIH3T3 de ratón. Sin embargo, no ocurre así en el epitelio cristalino. Se supone que el gen de la α B cristalina está expresado al máximo en estas células (por eso hay tanta α B) y que, por tanto, en este lugar no pueden aumentar más por un choque térmico. Las fibras cristalinas no pueden responder al choque térmico porque no tienen núcleo, aunque las fibras son vulnerables al estrés de su entorno.

6. Actividad tipo caperona molecular de la α cristalina

Las caperona molecular impiden la pérdida de estructura tridimensional correcta, evitando así la formación de estructuras incorrectas. Así, se produce una interacción con una proteína desplegada o desnaturalizada, favoreciendo su plegamiento o evitando que forme grandes agregados (Das et al. 1999)¹¹⁰.

Existen diversas caperona molecular:

- sHSP: HSP25, HSP27.
- HSP grandes: GroEL/HSPp60, HSP70, HSP90.

La α cristalina funciona como una caperona molecular, evitando la agregación térmica de las demás proteínas cristalinas (β y γ cristalinas) y de otras proteínas (Lee et al. 1997)¹¹¹.

La α cristalina pliega las cristalinas β y γ desplegadas y evita las interacciones proteicas no deseadas y su desnaturalización.

Además de proteger a las cristalinas β y γ (Boyle y Takemoto 1994)¹¹², la α cristalina puede unirse a:

- Proteínas de membrana.

- Proteínas del citoesqueleto (actina, desmina, vimentina). La α cristalina inhibe, in vitro, la polimerización de la actina y la unión vimentina-GFAP (proteína ácida gliofibrilar). Los filamentos intermedios podrían ser un lugar diana fundamental en la actividad caperona de la α B cristalina en el cristalino (Muchowski et al. 1999)¹¹³. Se supone que los protegería de posibles interacciones no covalentes que ocurren cuando se aproximan mucho los filamentos entre sí (Perng et al. 1999)¹¹⁴.

La protección que confiere la α cristalina ocurre sólo a más de 30 °C (protección casi total a 55 °C). La curva protección-temperatura es sigmoide, sugiriendo una alteración estructural. Se supone que la protección que ofrece la α cristalina se consigue proporcionando o aumentando superficies hidrófobas en lugares apropiados mediante una modificación de la estructura cuaternaria (Walsh et al. 1991)¹⁰².

Parece ser que la α B cristalina tiene más acción protectora ante la agregación no térmica. Sin embargo, cuando la agregación es dependiente de la temperatura (aumentando ésta experimentalmente) la α A cristalina actúa antes que la α B cristalina (45 °C frente a 50 °C) (Datta y Rao 1999)¹¹⁵.

Las caperonas moleculares pueden establecer una unión con las proteínas parcialmente desnaturizadas que es reversible añadiendo ATP. Sin embargo, esta reversibilidad no ocurre con las α cristalinas (no es raro, ya que hay relativamente poco ATP en las fibras cristalinas) (Muchowski et al. 1999b)¹¹⁶.

Con la edad se van formando complejos de α cristalina con proteínas parcialmente desnaturizadas. Además, la α cristalina restante va perdiendo la capacidad protectora, con lo que avanza la cataratogénesis. La formación de puentes disulfuro en la α A cristalina se ha relacionado con la disminución de la actividad caperona que ocurre con la edad (Cherian-Shaw et al. 1999)¹¹⁷.

Varios autores analizan las zonas de la α cristalina que podrían estar implicadas en su actividad caperona (Muchowski et al. 1999b, Crabbe y Goode 1994, Lindner et al. 1998, Derham y Harding 1999)^{116,118-120}:

- Región C-terminal. Puede ser importante en la protección de las proteínas frente al choque térmico, interviniendo en el plegamiento proteico como caperona, uniéndose a residuos cargados de modo opuesto. Las interacciones entre péptidos con acción caperona y los péptidos desplegados son no covalentes.
- Región N-terminal. Las interacciones que conducen a la agregación ocurren en esta región, ya que contiene un sitio hidrofóbico importante para formar agregados. Este sitio contiene la secuencia homóloga mayor entre αA y αB (larga, hidrofóbica y rica en Phe: RLFDQFF); esta secuencia es similar en distintas sHSP. En la agregación, se supone que las interacciones son hidrofóbicas y relacionadas con la secuencia RLFDQFF.
- Core. Determinados residuos situados en el *core* de la αB cristalina podrían ser fundamentales en su actividad caperona.

La protección caperona de la α cristalina depende de la temperatura, determinados cofactores, concentración proteica y modificaciones postraduccionales (Raman y Rao 1994)¹²¹. La modulación de la actividad caperona de la α cristalina ha sido estudiada mediante α cristalina bovina in vitro, habiéndose analizado la influencia de metabolitos celulares comunes, como la pantetina y el glutatión (Clark y Huang 1996)¹²².

VI. CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS CRISTALINAS ASOCIADOS A LA EDAD

1. Generalidades

La edad está íntimamente asociada a la cataratogénesis. Con la edad, las cristalinas α , β , y γ pierden solubilidad y estabilidad, lo que se traduce en una alteración en la normal refracción de los rayos de luz y en la formación de la catarata (Slingsby et al. 1997)¹⁰⁷.

El primer cambio asociado al envejecimiento es una conversión gradual de las proteínas que, de pertenecer al grupo de proteínas WS, pasan a pertenecer, debido a modificaciones postraduccionales y cambios en la síntesis proteica, al grupo WI (Zigler y Goosey 1981)¹⁹. De este modo, se pasa del 3% de proteínas insolubles en el cristalino humano de 10 años al 40% en el cristalino sin catarata de 80-90 años y a más del 70% si existe ésta (Clark et al. 1969)¹²³. Las modificaciones postraduccionales se producen, principalmente, en el núcleo del cristalino, mientras que los cambios en la síntesis proteica son predominantemente corticales (Harding y Dilley 1976)¹²⁴.

El cristalino añoso tiene aumento de peso, grosor, coloración, “fluorescencia no-triptófano”, contenido en carbonilos (Suárez-Sanz et al. 1996)¹²⁵ y absorbancia de luz (la absorbancia de luz de menos de 400 nm es doble a los 76 años que a los 42) (Horwitz et al. 1999)⁹⁷. Además, se consideran cambios asociados al envejecimiento los siguientes: formación de puentes disulfuro, entrecruzamiento intermolecular covalente no disulfuro, acumulación de agregados HMW, producción de fotosensibilizantes y radicales libres, proteólisis de cadenas polipeptídicas y glicación no enzimática (Berman 1991)²⁵.

2. Familia de las α cristalinas

La pérdida de las cristalinas solubles de 10-22 kDa se considera como una alteración ligada al envejecimiento. Hacia los 40-50 años se produce una desaparición

abrupta de la α cristalina soluble en agua en el núcleo del cristalino, lo cual refuerza la idea de la existencia de una función adicional para las α cristalinas aparte de la estructural (Horwitz et al. 1999)⁹⁷. En la corteza cristaliniiana el descenso en la concentración de α cristalina es gradual. Se va produciendo un aumento en la proporción $\alpha B / \alpha A$ (Ma et al. 1998)⁴³.

Paralelamente a la disminución de α cristalina soluble se van creando agregados HMW, formados principalmente por cadenas polipeptídicas de α cristalina. Esto ocurre inicialmente en el núcleo del cristalino (Spector 1984)⁴⁰. Los enlaces que se crean en el interior de los agregados son no covalentes, es decir, enlaces débiles que pueden deshacerse mediante detergentes y otros agentes (Berman 1991)²⁵.

3. Superfamilia de las cristalinas β y γ

La concentración de las cristalinas β y γ en el núcleo cristaliniiano se reduce en casi un 50% entre los 10 y los 50 años de edad existiendo, al igual que lo que ocurre con las α cristalinas, un descenso gradual en el córtex (Horwitz et al. 1999)⁹⁷.

La $\beta B2$ cristalina, que es la más abundante del grupo de las β cristalinas, se forma en las fibras cristaliniianas neoformadas durante toda la vida, pero las fibras más próximas al núcleo ven reducida su concentración paulatinamente. Debido a la proteólisis de la región N-terminal se produce un descenso, asociado a la edad, del peso molecular de la $\beta B2$ cristalina, que pasa de 26 a 22-23 kDa (Takemoto et al. 1987)¹²⁶. El aumento de edad también se asocia con un descenso en la concentración de $\beta B3$ cristalina, que es un componente fetal importante, pero casi inapreciable en cristalinos humanos de más de 3 años de edad (Ma et al. 1998)⁴³. Además, disminuyen dos polipéptidos presentes en la fracción de las β cristalinas, de 27 y 29 kDa (presumiblemente $\beta B1$ cristalina), respectivamente (Alcala et al. 1988)¹²⁷.

Las fracción de las γ cristalinas se vuelve más heterogénea y ácida cuanto mayor es la edad del cristalino estudiado. Se producen modificaciones covalentes, que podrían

ser debidas a proteasas, cambios oxidativos o ambas (Berman 1991)²⁵. La insolubilización creciente de las γ cristalinas se ha relacionado con la pérdida de grupos sulfhidrilo; con el correspondiente aumento de enlaces disulfuro en cristalino bovino, pero no en cristalino humano (Yu et al. 1988)¹²⁸. Con la edad, aumenta la proporción γ S / γ C (Ma et al. 1998)⁴³.

4. Polipéptidos degradados

Con SDS-PAGE se ve que aumenta la cantidad de polipéptidos degradados en las tres fracciones proteicas. Primero aparecen en la fracción WS (en cristalinos de 10-30 años), después en WI-US y, por último, en WI-UI. Separando, en cristalinos de 50 años, los polipéptidos degradados mediante HPLC, se distinguen cinco tipos, con un peso molecular situado entre 3 y 18 kDa. Se supone que los polipéptidos degradados (proteolisis de las cristalinas) de WS y WI se polimerizan con la edad y forman agregados HMW, lo que conduce a su insolubilización (Srivastava 1988)¹²⁹.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Conocer los siguientes aspectos del desarrollo postnatal de las proteínas cristalinas del cerdo, entre 0,5 y 97 meses, independientemente de la formación de catarata:

1. Analizar la agregación proteica que ocurre con la edad en la fracción soluble en agua a partir del porcentaje que representa esta fracción respecto del total de proteínas del cristalino.
2. Estudiar la oxidación proteica y su variación con la edad mediante cuantificación de grupos carbonilo.
3. Conocer el porcentaje que representa cada subfracción GF-HPLC respecto del total de la fracción soluble en agua y su variación entre las edades mencionadas.
4. Estudiar la agregación proteica que ocurre con la edad de modo indirecto, mediante el estudio de la fluorescencia no triptófano en cada subfracción.
5. Estudiar el ataque fotooxidativo al triptófano que ocurre con la edad, estudiando la fluorescencia debida al triptófano en cada subfracción.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL

1. Sustancias químicas

Las sustancias químicas fueron adquiridas a *Sigma Chemical Company*, *Bio-Rad* y *Merck*. Todos los reactivos fueron de la máxima calidad analítica disponible.

2. Animales empleados

Se sacrificaron 17 cerdos (*Sus domesticus*) pertenecientes a la raza minipig en el momento de la extracción de sus cristalinos. Habían sido criados en una granja de producción animal y controlados a través de su laboratorio. Las edades de los animales utilizados estaban comprendidas entre 0,5 a 97 meses, pudiendo diferenciarse en los grupos siguientes, según el criterio de Bustad (Bustad 1980)¹³⁰ y subdividiendo el grupo de adultos jóvenes: Inmaduros (desde el nacimiento hasta 10 meses); Adultos jóvenes (de 10 a 48 meses), Precoz (de 10 a 25 meses), Tardío (de 25 a 48 meses); y Mediana edad (de 48 a 97 meses).

3. Obtención de los cristalinos porcinos

Se obtuvieron los cristalinos de los cerdos mediante extracción extracapsular, a través de una capsulorrexis circular continua, procurando obtener, junto al núcleo, todo el córtex posible. Se conservaron en suero fisiológico y almacenaron a – 40 °C hasta que fueron procesados.

En la mayoría de los casos se extrajeron ambos cristalinos. En algunos de estos se analizaron conjuntamente ambos, debido a la escasez de la muestra; en estos animales, para su posterior análisis, se ha considerado que el cristalino es único. Finalmente el número de muestras fue de 24 (n = 24).

II. MÉTODOS

1. Preparación de los cristalinós

Los cristalinós fueron homogeneizados en 1,5 ml de solución tampón estándar a 4 °C (fosfato sódico 50mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól 0,1 mM y 0,02% de ácida sódica; pH 7) usando un homogeneizador de Dounce con émbolo de vidrio.

Los homogeneizados fueron centrifugados a 30.000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se dializaron frente a agua destilada durante la noche, usando una membrana de *Spectra / Por Mwco:3500*. Los dializados conseguidos constituyen la fracción proteica soluble en agua o *water soluble* (WS); se almacenaron a – 40 °C hasta su posterior análisis.

2. Cromatografía líquida de alta resolución con filtración en gel (GF-HPLC)

Las fracciones WS fueron analizadas mediante filtración en gel en un sistema HPLC equipado con una bomba tipo *Kontron Pump 420* y un formador de gradientes *Gradient Former 425*, ambos de Kontron, usando una columna *Bio-Silect SEC-125* (300 x 7,8 mm) conectada en serie con una columna protectora *Bio-Silect 125* (50 x 7,8 mm), ambas de *Bio-Rad*.

Las elución de las muestras se realizó empleando una solución tampón compuesta por fosfato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,15 M, ácida sódica 0,01 M; pH 6,8, y con un flujo de 1 ml / minuto.

Para la detección se han empleado un espectrofotómetro *UV-Vis* con detección simultánea a dos longitudes de onda diferentes, modelo *Kontron 430*, y un detector de fluorescencia *Kontron SFM 25*, conectados en serie.

La absorbancia de las proteínas se midió a 280 nm. Para la medición de la fluorescencia debida al triptófano se emplearon fracciones WS de 10 µg de proteína, con una longitud de onda de excitación de 280 nm y una de emisión de 345 nm. Para valorar la fluorescencia no debida al triptófano se emplearon alícuotas de 200 µg de proteína, con una longitud de onda de excitación de 345 nm y una de emisión de 420 nm.

La obtención de los parámetros cromatográficos que han permitido la caracterización de las fracciones cromatográficas en función de sus pesos moleculares, así como la integración de las áreas situadas bajo los picos y los hombros de los cromatogramas, obtenidos a partir de los análisis espectrofotométricos y fluorométricos, se ha basado en la utilización del programa *Kontron Data System 450-MT2*, también utilizado para el control de los módulos del sistema cromatográfico.

En cada fracción WS se separaron las siguientes subfracciones, caracterizadas por su peso molecular:

- a. Primera fracción (α H): 276 kDa.
- b. Segunda fracción (β H): 135 kDa.
- c. Tercera fracción (intermedia): 62 kDa.
- d. Cuarta subfracción (β L): 37 kDa.
- e. Quinta subfracción: 9 kDa.
- f. Sexta subfracción: 5 kDa.

3. Valoración de grupos carbonilo

El contenido en grupos carbonilo de las proteínas se ha cuantificado utilizando como reactivo dinitrofenilhidracina (DNPH), según un método ya descrito por otros autores (Oliver et al. 1987)¹³¹. La absorbancia se determinó a 370 nm mediante un espectrofotómetro modelo *Uvikon 930* de *Kontron*, y la expresión molar del contenido en derivados de DNPH se obtuvo empleando un coeficiente de extinción molar de 21,0/mM cm.

4. Cuantificación de proteínas

La valoración de proteína se ha realizado por espectrofotometría, empleando un espectrofotómetro modelo *Ultrospec 2000* de *Pharmacia Biotech*. Se ha usado un kit suministrado por *Bio-Rad*. La absorbancia se ha medido a 700 nm.

5. Análisis estadístico

Se han dividido las muestras estudiadas en cuatro grupos según su edad: de 0,5 a 10 meses (grupo 1), de 20,5 a 24 meses (grupo 2), de 31 a 48 meses (grupo 3) y de 65 a 97 meses (grupo 4). Se han elegido estos grupos por corresponder a las divisiones de la vida del cerdo, descritas previamente por otro autor (Bustad 1980)¹³⁰.

La comparación de la media de los diferentes parámetros entre los cuatro grupos fue realizada mediante tests de Kruskal-Wallis y de Bonferroni, utilizando el programa estadístico *SPSS*.

RESULTADOS

I. FRACCIÓN SOLUBLE EN AGUA

1. Estadística descriptiva

Se han obtenido las fracciones solubles en agua (WS) de las distintas muestras cristalinas (ver tabla 2). La media de todas las muestras es de 67,7%, con una desviación estándar (DS) de 12,71, un valor máximo y mínimo de 95,4 y 46,13% respectivamente, y una mediana de 64,46%.

Edad	% de WS	Edad	% de WS
0,5	69,6	31	62,04
5	58,4	32	56,23
7,5	66,4	32	46,13
10	95,4	45	73,40
20'5	78,28	48	55,81
20'5	70,73	65	84,1
21	73,13	66	87,7
21	82,51	69	71,94
21'5	61,56	72	60,82
21'5	84,41	72	61,97
24	54,59	97	54,36
31	62,52	97	52,76

Tabla 2. Fracción soluble en agua (WS).

Posteriormente, se han dividido en cuatro grupos según su edad (grupo 1 de 0,5 a 10 meses; grupo 2 de 20,5 a 24 meses; grupo 3 de 31 a 48 meses; y grupo 4 de 65 a 97 meses) (ver tabla 3).

Grupos	N	Media	DS	Mín.	Máy.	Mediana
1	4	72,45	16,01	58,4	95,4	68
2	7	72,17	10,99	54,59	84,41	73,13
3	6	59,36	9,074	46,13	73,4	59,14
4	7	67,66	13,95	52,76	87,7	61,97

Tabla 3. Fracción soluble en agua (WS).

2. Estadística analítica

Se ha realizado un test de Kruskal-Wallis para comparar la media de los cuatro grupos, obteniéndose $p = 0,396$.

II. CONTENIDO EN GRUPOS CARBONILO

1. Estadística descriptiva

Se ha medido el contenido en grupos carbonilo (nmol / mg proteína) de las distintas muestras cristalinianas (ver tabla 4). La media de todas las muestras es de 7,92 nmol / mg proteína, con una DS de 1,13, un valor máximo y mínimo de 10,76 y 5,17 nmol /mg proteína respectivamente, y una mediana de 8,02 nmol / mg proteína.

Edad	Contenido Carbonilo	Edad	Contenido Carbonilo
0,5	8,27	31	7,8
5	7,19	32	7,27
7,5	6,47	32	6,79
10	8,34	45	8,19
20,5	7,54	48	8,06
20,5	8,33	65	7,98
21	7,89	66	8,62
21	8,35	69	7,22
21,5	10,13	72	6,95
21,5	10,76	72	5,17
24	8,55	97	8,82
31	8,2	97	7,15

Tabla 4. Contenido en grupos carbonilo.

A continuación, se han dividido en cuatro grupos según su edad (grupo 1 de 0,5 a 10 meses; grupo 2 de 20,5 a 24 meses; grupo 3 de 31 a 48 meses; y grupo 4 de 65 a 97 meses) (ver tabla 5).

Grupos	N	Media	DS	Mín.	Máx.	Mediana
1	4	7,57	0,90	6,47	8,34	7,73
2	7	8,79	1,19	7,54	10,76	8,35
3	6	7,72	0,57	6,79	8,2	7,93
4	7	7,42	1,23	5,17	8,82	7,22

Tabla 5. Contenido en grupos carbonilo.

2. Estadística analítica

Se ha realizado un test de Kruskal-Wallis para comparar la media de los cuatro grupos, obteniéndose $p = 0,166$.

III. CONTENIDO EN PROTEÍNA

1. Estadística descriptiva

Tras separar mediante HPLC cada fracción WS en cinco subfracciones caracterizadas por su peso molecular, se ha medido el contenido en proteína de las distintas subfracciones, indicando el porcentaje que representa cada subfracción respecto a su fracción WS correspondiente (ver tabla 6). La media de todas las muestras es de 27,95% *para la primera subfracción* (con una DS de 3,91, un valor máximo y mínimo de 37,48 y 21,89% respectivamente, y una mediana de 27,4%), 25,58% *para la segunda subfracción* (con una DS de 3,5, un valor máximo y mínimo de 35,12 y 21,17% respectivamente, y una mediana de 24,86%), 8,82% *para la tercera subfracción* (con una DS de 2,37, un valor máximo y mínimo de 14,21 y 5,72% respectivamente, y una mediana de 8,18%), 18,76% *para la cuarta subfracción* (con una DS de 4,33, un valor máximo y mínimo de 24,73 y 8,39% respectivamente, y una mediana de 19,6%), 9,6% *para la quinta subfracción* (con una DS de 3,32, un valor máximo y mínimo de 14,25 y 2,07% respectivamente, y una mediana de 10,62%) y 9,26% *para la sexta subfracción* (con una DS de 2,3, un valor máximo y mínimo de 15,33 y 5,42% respectivamente, y una mediana de 9,32%).

Posteriormente, se han dividido en cuatro grupos según su edad (grupo 1 de 0,5 a 10 meses; grupo 2 de 20,5 a 24 meses; grupo 3 de 31 a 48 meses; y grupo 4 de 65 a 97 meses) (ver tablas 7-11).

Edad	Porcentaje del total de proteínas					
	α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
0,5	25,07	35,12	13,98	8,39	2,07	15,33
5	29,28	25,61	14,21	14,12	4,51	12,24
7,5	32,86	24,62	10,38	15,95	4,81	11,34
10	33,26	22,92	10,74	18,93	3,58	10,54
20,5	22,44	25,39	7,87	21,99	12,04	10,24
20,5	24,97	23,06	7,77	22,73	11,23	10,17
21	22,47	24,1	7,38	24,21	10,64	11,18
21	27,4	21,17	6,4	22,86	12,27	9,87
21,5	25,26	22,17	7,69	24,73	11,39	8,74
21,5	25	23,94	8,11	24,25	9,5	9,18
24	37,48	26,39	7,82	14,35	6,62	7,3
31	30,49	24,35	9,6	20,65	7,39	7,5
31	29,45	25,1	8,9	22,14	8,1	6,26
32	31,49	25,95	6,27	21,3	9,3	5,67
32	27,34	24,4	6,77	22,57	11,24	7,61
45	24,15	25,59	8,91	21,53	12,63	7,17
48	30,11	32,96	5,8	17,03	8,65	5,42
65	29,64	23,34	5,72	20,26	12,2	8,81
66	32,45	22,32	7,69	16,85	11,21	9,46
69	25,2	25,7	8,4	17,8	10,6	12,3
72	26,27	30,14	12,71	13,03	9,27	8,55
72	29,42	21,20	11,58	15,47	12,75	9,54
97	21,89	29,52	8,24	15,94	14,25	10,14
97	27,4	28,75	8,72	13,18	14,24	7,67

Tabla 6. Contenido en proteína.

Grupos	N	Media					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	30,12	27,07	12,33	14,35	3,74	12,36
2	7	26,43	23,75	7,58	22,16	10,53	9,53
3	6	28,84	26,39	7,71	20,87	9,55	6,6
4	7	27,47	25,85	9,01	16,08	12,07	9,5

Tabla 7. Media del contenido en proteína.

Grupos	N	DS					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	3,81	5,48	2,05	4,44	1,23	2,1
2	7	5,17	1,8	0,56	3,58	1,95	1,26
3	6	2,68	3,18	1,61	2	2	0,95
4	7	3,44	3,67	2,38	2,55	1,86	1,47

Tabla 8. DS del contenido en proteína.

Grupos	N	Mín.					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	25,07	22,92	10,38	8,39	2,07	10,54
2	7	22,44	21,17	6,4	14,35	6,62	7,3
3	6	24,15	24,35	5,8	17,03	7,39	5,42
4	7	21,89	21,2	5,72	13,03	9,27	7,67

Tabla 9. Valor mínimo del contenido en proteína.

Grupos	N	Máx.					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	33,26	35,12	14,21	18,93	4,81	15,33
2	7	37,48	26,39	8,11	24,73	12,27	11,18
3	6	31,49	32,96	9,6	22,57	12,63	7,61
4	7	32,45	30,14	12,71	20,26	14,25	12,3

Tabla 10. Valor máximo del contenido en proteína.

Grupos	N	Mediana					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	31,07	25,12	12,36	15,04	4,05	11,79
2	7	25	23,94	7,77	22,86	11,23	9,87
3	6	29,78	25,35	7,84	21,42	8,98	6,72
4	7	27,4	25,7	8,4	15,94	12,2	9,46

Tabla 11. Mediana del contenido en proteína.

2. Estadística analítica

Para cada subfracción, se ha realizado un test de Kruskal-Wallis para comparar la media del contenido de proteína de cada uno de los cuatro grupos, obteniéndose:

- a. Primera subfracción: $p = 0,284$.
- b. Segunda subfracción: $p = 0,356$.
- c. Tercera subfracción: $p = 0,024$.
- d. Cuarta subfracción: $p = 0,004$.
- e. Quinta subfracción: $p = 0,007$.
- f. Sexta subfracción: $p = 0,001$.

En aquellas subfracciones en las que la media de los distintos grupos es distinta ($p < 0,05$) se ha aplicado el test de Bonferroni, para conocer exactamente qué grupos son los que tienen distinta media entre sí. Se indican sólo los valores estadísticamente significativos, con la media de las diferencias (MD), el error estándar (ES) y el intervalo de confianza 95% (IC).

a. Tercera subfracción.

- Grupos 1 y 2: distintos ($p = 0,002$; MD = 4,75; ES = 1,1; IC = 1,53 y 7,97).
- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,003$; MD = 4,62; ES = 1,13; IC = 1,31 y 7,93).
- Grupos 1 y 4 : distintos ($p = 0,04$; MD = 3,32; ES = 1,1; IC = 0,1 y 6,53).

b. Cuarta subfracción.

- Grupos 1 y 2: distintos ($p = 0,04$; MD = 7,81; ES = 1,96; IC = 2,08 y 13,54).
- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,025$; MD = 6,52; ES = 2,02; IC = 0,62 y 12,42).
- Grupos 2 y 4 : distintos ($p = 0,01$; MD = 6,08; ES = 1,67; IC = 1,2 y 10,97).

c. Quinta subfracción.

- Grupos 1 y 2: distintos ($p < 0,001$; MD = 6,78; ES = 1,16; IC = 3,4 y 10,17).
- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,001$; MD = 5,81; ES = 1,19; IC = 2,32 y 9,3).
- Grupos 1 y 4 : distintos ($p < 0,001$; MD = 8,33; ES = 1,16; IC = 4,95 y 11,72).

d. Sexta subfracción.

- Grupos 1 y 2: distintos ($p = 0,027$; MD = 2,84; ES = 0,89; IC = 0,24 y 5,44).

- Grupos 1 y 3: distintos ($p < 0,001$; MD = 5,76; ES = 0,91; IC = 3,08 y 8,44).
- Grupos 1 y 4 : distintos ($p = 0,025$; MD = 2,87; ES = 1,89; IC = 0,27 y 5,47).
- Grupos 2 y 3: distintos ($p = 0,008$; MD = 2,92; ES = 0,79; IC = 0,61 y 5,23).
- Grupos 3 y 4: distintos ($p = 0,009$; MD = 2,89; ES = 0,79; IC = 0,58 y 5,2).

IV. FLUORESCENCIA NO TRIPTÓFANO

1. Estadística descriptiva

Se ha medido la intensidad de fluorescencia no triptófano (FNT; unidades fluorescencia / μg proteína) en las distintas subfracciones (ver tabla 12). La media de todas las muestras es de 0,2802 F/ μg *para la primera subfracción* (con una DS de 0,15769, un valor máximo y mínimo de 0,67 y 0,07 F/ μg respectivamente, y una mediana de 0,2445 F/ μg), 0,2216 F/ μg *para la segunda subfracción* (con una DS de 0,11332, un valor máximo y mínimo de 0,46 y 0,05 F/ μg respectivamente, y una mediana de 0,222 F/ μg), 0,1529 F/ μg *para la tercera subfracción* (con una DS de 0,10475, un valor máximo y mínimo de 0,02 y 0,4 F/ μg respectivamente, y una mediana de 0,1315 F/ μg), 0,1154 F/ μg *para la cuarta subfracción* (con una DS de 0,06591, un valor máximo y mínimo de 0,32 y 0,03 F/ μg respectivamente, y una mediana de 0,105 F/ μg), 0,0895 F/ μg *para la quinta subfracción* (con una DS de 0,04707, un valor máximo y mínimo de 0,21 y 0,02 F/ μg respectivamente, y una mediana de 0,088 F/ μg) y 0,0646 F/ μg *para la sexta subfracción* (con una DS de 0,04922, un valor máximo y mínimo de 0,23 y 0,01 F/ μg respectivamente, y una mediana de 0,056 F/ μg).

Posteriormente, se han dividido en cuatro grupos según su edad (grupo 1 de 0,5 a 10 meses; grupo 2 de 20,5 a 24 meses; grupo 3 de 31 a 48 meses; y grupo 4 de 65 a 97 meses) (ver tablas 13-17).

Edad	Fluorescencia no triptófano					
	α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
0,5	0,07	0,05	0,02	0,04	0,03	0,02
5	0,1	0,08	0,03	0,03	0,03	0,01
7,5	0,08	0,09	0,04	0,04	0,02	0,02
10	0,12	0,1	0,05	0,04	0,05	0,02
20,5	0,22	0,15	0,10	0,1	0,11	0,09
20,5	0,2	0,14	0,15	0,1	0,12	0,08
21	0,17	0,13	0,09	0,08	0,11	0,08
21	0,16	0,13	0,11	0,09	0,09	0,07
21,5	0,2	0,16	0,09	0,07	0,05	0,04
21,5	0,21	0,18	0,09	0,09	0,12	0,01
24	0,29	0,24	0,16	0,10	0,05	0,04
31	0,4	0,28	0,14	0,13	0,07	0,05
31	0,32	0,26	0,13	0,11	0,06	0,05
32	0,26	0,27	0,22	0,14	0,08	0,06
32	0,29	0,26	0,18	0,14	0,12	0,1
45	0,17	0,15	0,09	0,07	0,05	0,05
48	0,34	0,20	0,4	0,13	0,09	0,04
65	0,23	0,25	0,16	0,11	0,11	0,07
66	0,38	0,38	0,32	0,22	0,12	0,15
69	0,3	0,30	0,11	0,14	0,11	0,08
72	0,49	0,24	0,14	0,15	0,08	0,06
72	0,47	0,41	0,17	0,12	0,11	0,08
97	0,67	0,41	0,34	0,23	0,18	0,1
97	0,6	0,46	0,36	0,32	0,21	0,24

Tabla 12. Fluorescencia no triptófano (F/ μ g).

Grupos	N	Media					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	0,09	0,08	0,03	0,04	0,03	0,01
2	7	0,21	0,16	0,11	0,09	0,09	0,06
3	6	0,3	0,24	0,19	0,12	0,08	0,06
4	7	0,45	0,35	0,23	0,19	0,13	0,11

Tabla 13. Media de la fluorescencia no triptófano (F/ μ g).

Grupos	N	DS					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	0,03	0,02	0,01	0,005	0,01	0,003
2	7	0,04	0,04	0,03	0,01	0,03	0,03
3	6	0,08	0,05	0,11	0,03	0,03	0,02
4	7	0,16	0,09	0,11	0,08	0,05	0,06

Tabla 14. DS de la fluorescencia no triptófano.

Grupos	N	Mín.					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	0,07	0,05	0,02	0,03	0,02	0,01
2	7	0,16	0,13	0,09	0,07	0,05	0,01
3	6	0,17	0,15	0,09	0,07	0,05	0,04
4	7	0,23	0,24	0,11	0,11	0,08	0,06

Tabla 15. Valor mínimo de la fluorescencia no triptófano (F/ μ g).

Grupos	N	Máx.					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	0,12	0,1	0,05	0,04	0,05	0,02
2	7	0,29	0,24	0,16	0,1	0,12	0,09
3	6	0,4	0,28	0,4	0,14	0,12	0,1
4	7	0,67	0,46	0,36	0,32	0,21	0,24

Tabla 16. Valor máximo de la fluorescencia no triptófano (F/ μ g).

Grupos	N	Mediana					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	0,09	0,08	0,03	0,04	0,03	0,02
2	7	0,2	0,15	0,10	0,09	0,11	0,07
3	6	0,31	0,26	0,16	0,13	0,07	0,05
4	7	0,47	0,38	0,17	0,15	0,11	0,08

Tabla 17. Mediana de la fluorescencia no triptófano (F/ μ g).

2. Estadística analítica

Para cada subfracción, se ha realizado un test de Kruskal-Wallis para comparar la media de la fluorescencia no triptófano de cada uno de los cuatro grupos, obteniéndose:

- Primera subfracción: $p = 0,001$.
- Segunda subfracción: $p < 0,001$.
- Tercera subfracción: $p = 0,003$.
- Cuarta subfracción: $p < 0,001$.
- Quinta subfracción: $p = 0,008$.
- Sexta subfracción: $p = 0,01$.

Se ha aplicado el test de Bonferroni, para conocer exactamente qué grupos son los que tienen distinta media entre sí, en todas las subfracciones, ya que en todas la media de los distintos grupos es distinta ($p < 0,05$). Se indican sólo los valores estadísticamente significativos, con la media de las diferencias (MD), el error estándar (ES) y el intervalo de confianza 95% (IC).

a. Primera subfracción.

- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,025$; MD = 0,2; ES = 0,06; IC = 0,02 y 0,39).
- Grupos 1 y 4: distintos ($p < 0,001$; MD = 0,36; ES = 0,06; IC = 0,18 y 0,54).
- Grupos 2 y 4 : distintos ($p = 0,001$; MD = 0,24; ES = 0,05; IC = 0,09 y 0,4).

b. Segunda subfracción.

- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,002$; MD = 0,16; ES = 0,04; IC = 0,05 y 0,27).
- Grupos 1 y 4: distintos ($p < 0,001$; MD = 0,28; ES = 0,04; IC = 0,17 y 0,38).
- Grupos 2 y 4 : distintos ($p < 0,001$; MD = 0,19; ES = 0,03; IC = 0,1 y 0,28).
- Grupos 3 y 4 : distintos ($p = 0,012$; MD = 0,11; ES = 0,03; IC = 0,02 y 0,21).

c. Tercera subfracción.

- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,04$; MD = 0,16; ES = 0,05; IC = 0,01 y 0,32).
- Grupos 1 y 4: distintos ($p = 0,007$; MD = 0,2; ES = 0,05; IC = 0,05 y 0,35).

d. Cuarta subfracción.

- Grupos 1 y 4: distintos ($p < 0,001$; MD = 0,15; ES = 0,03; IC = 0,07 y 0,23).

- Grupos 2 y 4: distintos ($p = 0,005$; MD = 0,09; ES = 0,02; IC = 0,02 y 0,16).

e. Quinta subfracción.

- Grupos 1 y 4: distintos ($p = 0,001$; MD = 0,1; ES = 0,02; IC = 0,04 y 0,16).

f. Sexta subfracción.

- Grupos 1 y 4: distintos ($p = 0,008$; MD = 0,09; ES = 0,03; IC = 0,02 y 0,17).

5. FLUORESCENCIA DEBIDA AL TRIPTÓFANO

1. Estadística descriptiva

Se ha medido la intensidad de fluorescencia debida al triptófano (FT; unidades fluorescencia / μg proteína) en las distintas subfracciones (ver tabla 18). La media de todas las muestras es de 36,89 F/ μg *para la primera subfracción* (con una DS de 13,08, un valor máximo y mínimo de 72,05 y 21,34 F/ μg respectivamente, y una mediana de 34,23 F/ μg), 30,51 F/ μg *para la segunda subfracción* (con una DS de 16,73, un valor máximo y mínimo de 66,56 y 10,08 F/ μg respectivamente, y una mediana de 24,99 F/ μg), 20,42 F/ μg *para la tercera subfracción* (con una DS de 12,29, un valor máximo y mínimo de 48,98 y 7,96 F/ μg respectivamente, y una mediana de 14,87 F/ μg), 22,95 F/ μg *para la cuarta subfracción* (con una DS de 18,22, un valor máximo y mínimo de 68,16 y 6,79 F/ μg respectivamente, y una mediana de 13,79 F/ μg), 11,56 F/ μg *para la quinta subfracción* (con una DS de 9,18, un valor máximo y mínimo de 37,2 y 2,88 F/ μg respectivamente, y una mediana de 7,53 F/ μg) y 11,26 F/ μg *para la sexta subfracción* (con una DS de 11,16, un valor máximo y mínimo de 38,13 y 2,41 F/ μg respectivamente, y una mediana de 5,96 F/ μg).

Posteriormente, se han dividido en cuatro grupos según su edad (grupo 1 de 0,5 a 10 meses; grupo 2 de 20,5 a 24 meses; grupo 3 de 31 a 48 meses; y grupo 4 de 65 a 97 meses) (ver tablas 19-23).

Edad	Fluorescencia debida al triptófano					
	α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
0,5	39,82	49,81	22,36	68,16	11,87	24,22
5	29,96	66,56	28,37	49,93	25,91	38,13
7,5	27,85	57,61	48,98	50,82	37,2	32,68
10	33,76	52,07	37,41	46,21	29,9	23,36
20,5	25,95	11,65	8,91	8,72	7,5	5,97
20,5	25,99	10,08	14,29	7,64	7,52	5,95
21	25,28	17,72	10,78	6,79	7,16	3,5
21	21,34	12,42	11,94	8,43	6,75	5,58
21,5	27,32	14,89	8,98	7,16	3,32	2,93
21,5	26,85	14,56	7,96	7,42	6,59	2,92
24	37,17	39,18	37,25	48,47	23,06	24,28
31	53,02	29,53	10,72	11,66	4,12	2,82
31	43,06	20,49	11,27	9,72	2,88	2,41
32	26,9	24,23	21,7	15,27	8,27	6,13
32	40,04	29,67	15,45	14,1	10,75	5,97
45	22,68	14,81	8,36	6,9	2,9	2,83
48	35,11	32,53	39,86	36	18,51	29,69
65	28,95	22,32	9,94	34,95	7,13	2,7
66	44,66	20,83	28,08	19,13	7,54	6,79
69	34,69	25,74	11	12,87	7,59	4,28
72	56,03	23,02	13,78	13,48	4,34	4,22
72	46,91	38,36	15,76	8,86	5,44	3,67
97	72,05	59,26	31,43	30,25	15,96	10,89
97	60	45,01	35,56	27,91	15,31	18,38

Tabla 18. Fluorescencia debida al triptófano (F/ μ g).

Grupos	N	Media					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	32,85	56,51	34,28	53,78	26,22	29,6
2	7	27,13	17,21	14,3	13,52	8,84	7,30
3	6	36,8	25,21	17,89	15,61	7,91	8,31
4	7	49,04	33,51	20,79	21,06	9,04	7,28

Tabla 19. Media de la fluorescencia debida al triptófano (F/ μ g).

Grupos	N	DS					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	5,25	7,46	11,59	9,79	10,65	7,07
2	7	4,84	10	10,35	15,43	6,44	7,61
3	6	11,07	6,69	11,74	10,43	6,09	10,6
4	7	14,9	14,58	10,59	10,01	4,66	5,61

Tabla 20. DS de la fluorescencia debida al triptófano.

Grupos	N	Mín.					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	27,85	49,81	22,36	46,21	11,87	23,36
2	7	21,34	10,08	7,96	6,79	3,32	2,92
3	6	22,68	14,81	8,36	6,9	2,88	2,41
4	7	28,95	20,83	9,94	8,86	4,34	2,7

Tabla 21. Valor mínimo de la fluorescencia debida al triptófano (F/ μ g).

Grupos	N	Máx.					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	39,82	66,56	48,98	68,16	37,2	38,13
2	7	37,17	39,18	37,25	48,47	23,06	24,28
3	6	53,02	32,53	39,86	36	18,51	29,69
4	7	72,05	59,26	35,56	34,95	15,96	18,38

Tabla 22. Valor máximo de la fluorescencia debida al triptófano (F/ μ g).

Grupos	N	Mediana					
		α H	β H	IM	β L	9kDa	5kDa
1	4	31,86	54,84	32,89	50,38	27,91	28,45
2	7	25,99	14,56	10,78	7,64	7,16	5,58
3	6	37,58	26,88	13,36	12,88	6,195	4,4
4	7	46,91	25,74	15,76	19,13	7,54	4,28

Tabla 23. Mediana de la fluorescencia debida al triptófano (F/ μ g).

2. Estadística analítica

Para cada subfracción, se ha realizado un test de Kruskal-Wallis para comparar la media de la fluorescencia debida al triptófano de cada uno de los cuatro grupos, obteniéndose:

- a. Primera subfracción: $p = 0,01$.
- b. Segunda subfracción: $p = 0,003$.
- c. Tercera subfracción: $p = 0,064$.
- d. Cuarta subfracción: $p = 0,005$.
- e. Quinta subfracción: $p = 0,043$.
- f. Sexta subfracción: $p = 0,047$.

Se ha aplicado el test de Bonferroni, para conocer exactamente qué grupos son los que tienen distinta media entre sí, en las subfracciones en las que la media de los distintos grupos es distinta ($p < 0,05$). Se indican sólo los valores estadísticamente significativos, con la media de las diferencias (MD), el error estándar (ES) y el intervalo de confianza 95% (IC).

a. Primera subfracción.

- Grupos 2 y 4: distintos ($p = 0,005$; MD = 21,91; ES = 5,57; IC = 5,62 y 38,2).

b. Segunda subfracción.

- Grupos 1 y 2: distintos ($p < 0,001$; MD = 39,3; ES = 6,67; IC = 19,77 y 58,83).
- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,001$; MD = 31,3; ES = 6,87; IC = 11,19 y 51,41).
- Grupos 1 y 4: distintos ($p = 0,015$; MD = 23,01; ES = 6,67; IC = 3,48 y 42,53).

c. Cuarta subfracción.

- Grupos 1 y 2: distintos ($p < 0,001$; MD = 40,26; ES = 7,5; IC = 18,32 y 62,21).
- Grupos 1 y 3: distintos ($p < 0,001$; MD = 38,17; ES = 7,72; IC = 15,57 y 60,77).
- Grupos 1 y 4: distintos ($p < 0,001$; MD = 32,72; ES = 7,5; IC = 10,77 y 54,66).

d. Quinta subfracción.

- Grupos 1 y 2: distintos ($p = 0,003$; MD = 17,38; ES = 4,21; IC = 5,04 y 29,71).
- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,004$; MD = 18,32; ES = 4,34; IC = 5,61 y 31,02).
- Grupos 1 y 4: distintos ($p = 0,004$; MD = 17,18; ES = 4,21; IC = 4,84 y 29,51).

e. Sexta subfracción.

- Grupos 1 y 2: distintos ($p = 0,001$; MD = 22,29; ES = 4,95; IC = 7,8 y 36,79).
- Grupos 1 y 3: distintos ($p = 0,003$; MD = 21,29; ES = 5,1; IC = 6,36 y 36,22).
- Grupos 1 y 4: distintos ($p = 0,001$; MD = 22,32; ES = 4,95; IC = 7,82 y 36,82).

DISCUSIÓN

I. PORCENTAJE DE FRACCIÓN SOLUBLE EN AGUA (WS)

En el presente trabajo se han estudiado las proteínas cristalinas presentes en la fracción soluble en agua (WS) de cristalinos porcinos, por lo que lo primero que se ha intentado ver es la relación existente entre el porcentaje que supone la fracción WS frente al total de proteínas cristalinas y su modificación con la edad del individuo.

El análisis estadístico compara la media del porcentaje de fracción WS entre los cuatro grupos de edad creados (de 0,5 a 10, de 20,5 a 24, de 31 a 48 y de 65 a 97 meses, respectivamente). Los resultados estadísticos no permiten afirmar que existan diferencias significativas entre los cuatro grupos.

En el análisis de la fracción WS de cristalinos porcinos de hasta 97 meses de edad, por tanto, no se ha podido encontrar una modificación en la proporción de proteínas cristalinas hidrosolubles respecto al total de proteínas a medida que avanza la edad del individuo estudiado.

Otros autores han descrito una disminución en la proporción de fracción WS con la cataratogénesis. Esto se ha atribuido a la agregación de las proteínas cristalinas, lo cual conlleva su insolubilización. Independientemente de la cataratogénesis, se ha observado un aumento de agregados de alto peso molecular (HMW) en edades avanzadas (Spector 1984)⁴⁰. El carácter apolar de los péptidos y la α -cristalina que constituyen los agregados HMW parecen incrementar la tendencia a la insolubilización.

A pesar de que cerdos de edades próximas a los 100 meses puedan parecer añosos, lo cierto es que no pueden considerarse como tales, ya que pueden vivir hasta 17 años (Bustad 1980)¹³¹. Los cristalinos estudiados no presentaban macroscópicamente, en ningún caso, una opacidad cristalina que pudiera considerarse como una indicación de cirugía de catarata en humanos.

De este modo, no se ha podido demostrar la agregación proteica en las muestras estudiadas.

II. CONTENIDO EN GRUPOS CARBONILO

Los valores encontrados la cuantificación de grupos carbonilos no son estadísticamente distintos en los cuatro grupos de edad analizados. El análisis estadístico señala como bastante probable encontrar datos como los encontrados cuando la media del contenido en grupos carbonilo es idéntica en todos los cuatro grupos.

La formación de grupos carbonilo es considerada como un indicador de envejecimiento (Garland et al. 1988)⁸¹, ya que éste suele acompañarse de una alteración oxidativa de las proteínas cristalinas hidrosolubles (Suárez-Sanz et al. 1996b)⁸⁰.

En el análisis de la fracción WS de cristalinos porcinos de hasta 97 meses de edad, por tanto, no se ha podido encontrar una modificación oxidativa en base a la cantidad de grupos carbonilo.

Como se ha dicho anteriormente, los cristalinos estudiados no eran cataratosos. Esto puede explicar que no se encuentre la relación lineal, que se ha demostrado al analizar cristalinos cataratosos humanos, entre el contenido en grupos carbonilo y la edad (Suárez-Sanz et al. 1996a)¹²⁵.

Otros autores no encontraron evidencia de oxidación proteica en cristalinos humanos jóvenes (Garner y Spector 1980)¹³².

III. CONTENIDO EN PROTEÍNA

El análisis de las proteínas de la fracción WS se ha hecho estudiando las seis fracciones encontradas mediante GF-HPLC. Es interesante señalar que el peso molecular de la segunda subfracción es aproximadamente la mitad del de la primera; del mismo modo, la tercera tiene un peso molecular algo menor que la mitad del peso de la segunda, la cuarta la mitad de la tercera, la quinta la mitad de la cuarta y la sexta la mitad de la quinta. Esto podría indicar una relación con la formación de agregados de peso molecular creciente.

En el total de las muestras, las subfracciones más pesadas, de 276 y 135 kDa, son las más abundantes (27,95 y 25,58% del total de proteínas, respectivamente); se identifican con la α H y la β H cristalina, respectivamente. Las subfracciones de 9, 5 y 62 kDa son las menos predominantes (9,60, 9,26 y 8,82%, respectivamente). La de 37 kDa, identificada con la β L cristalina, tiene una importancia mayor que estas últimas (18,76%).

La mayor importancia relativa de la primera y la segunda subfracción se mantiene con relación a la edad de los individuos estudiados.

En la evolución de cada subfracción con respecto a la edad, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la media de la proporción de la subfracción de 276 kDa de los cuatro grupos de edad estudiados. Idéntico resultado se ha obtenido al estudiar la subfracción de 135 kDa.

Sin embargo las otras cuatro subfracciones sí parecen ver modificada sustancialmente su importancia relativa dentro del total de proteínas de la fracción WS. Así, en la tercera subfracción se encuentra una disminución estadísticamente significativa de la cantidad existente en el primer grupo de edad (0,5 a 10 meses), que se mantiene disminuida pero sin disminuir más en los tres grupos de edades superiores.

En cuanto a la subfracción de la β L cristalina, existe un aumento a partir de los 10 meses de edad, mantenido hasta los 65 meses. El grupo de más edad tiene, con

significación estadística, menos proporción de esta subfracción que el grupo de 20,5 a 24 meses. De este modo parece haber un aumento en las edades intermedias, con posterior descenso a partir de una edad más avanzada.

La quinta subfracción es muy escasa en las muestras de los cerdos más jóvenes, aumentando de modo significativo a partir de los 20 meses y manteniéndose constante a partir de entonces.

La variación encontrada en la subfracción de 5 kDa es un descenso de la proporción de la misma de modo progresivo en los tres primeros grupos de edad, aumentando en el cuarto grupo. Esta variación marca diferencias estadísticamente significativas en las medias de los distintos grupos, tanto en la disminución como en el aumento final.

En resumen, en los cristalinicos analizados no se encuentran variaciones en la importancia relativa de las subfracciones de 276 y 135 kDa con la edad. La proporción de la de 62 kDa desciende y se mantiene. La de 9 kDa aumenta y se mantiene. La de 5 kDa desciende hasta edades avanzadas y vuelve a aumentar. La de 37 kDa se mantiene más elevada en los dos grupos de edades intermedias.

Se ha descrito una relación entre envejecimiento y disminución de cristalinicos solubles de 10 a 22 kDa (Horwitz et al. 1999)⁹⁷. El no encontrar esta disminución en nuestras muestras se debería, una vez más, a que los cerdos estudiados no son lo suficientemente añosos para considerarlos viejos.

Las subfracciones más pequeñas, correspondientes a polipéptidos degradados sufren un aumento en la fracción WS, en humanos, entre los 10 y 30 años de edad. Con la edad se polimerizan y forman agregados HMW, que conducen a la insolubilización (Srivastava 1988)¹²⁹. En las muestra porcinas se ve el aumento de la subfracción de 9 kDa entre los grupos de edad primero y segundo; en la de 5 kDa hay un descenso, pero con aumento hacia los 65 meses. Estos datos son más parejos ya que las edades serían más comparables.

IV. FLUORESCENCIA NO TRIPTÓFANO

La fluorescencia no debida al triptófano es aquella caracterizada por una excitación a 345 nm y una emisión a 420 nm, en relación con una absorbancia a 280 nm (F420/A280). Se ha medido para cada una de las subfracciones de las fracciones proteicas WS.

La media de la intensidad de fluorescencia no triptófano encontrada es mayor cuanto mayor es el peso molecular de la subfracción de HPLC estudiada: 0,28 F/ μ g para la primera subfracción, 0,22 para la segunda, 0,15 para la tercera, 0,12 para la cuarta, 0,09 para la quinta y 0,06 para la sexta.

El análisis por grupos de edad muestra diferencias estadísticamente significativas entre la media de los cuatro grupos en las seis subfracciones analizadas.

En la primera subfracción se aprecia un aumento de la fluorescencia no triptófano con la edad. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo más joven y los dos más añosos, así como entre los grupos segundo y cuarto.

En la subfracción de 135 kDa se han encontrado resultados similares a los de la primera subfracción, es decir, aumento con la edad y diferencias significativas entre los grupos mencionados. Además el aumento es estadísticamente significativo entre los grupos tercero y de más de 65 meses.

En la subfracción intermedia se produce un aumento significativo en los dos grupos de más edad en comparación con el de menos.

La cuarta subfracción presenta una media de intensidad de fluorescencia no triptófano significativamente mayor en el grupo más añoso respecto a los dos más jóvenes.

Las subfracciones menos pesadas, de 9 y 5 kDa, muestran también un aumento progresivo con la edad, que es significativo entre el primer y el cuarto grupo.

La evidencia de una mayor intensidad de fluorescencia no triptófano según el peso molecular de cada subfracción de HPLC ya se había descrito en cristalinos cataratosos humanos previamente (Suárez Sanz et al. 1996b)⁸⁰.

Podría existir un papel desarrollado por un componente fluorescente en la formación de enlaces cruzados de monómeros de bajo peso molecular para formar agregados de tamaño mayor.

Un fluoróforo de características similares (excitación a 355 nm y emisión a 420 nm) ha sido descrito por otros autores (Bessems et al. 1987; Bessems y Hoenders 1987)^{133,134}. Tendría un peso molecular de aproximadamente 0,4 kDa. Este fluoróforo no parece ser el triptófano, debido a que tiene mayor hidrofobicidad que éste, a que no hay cambios significativos en el contenido de triptófano en el núcleo de las cataratas y a que no se han encontrado derivados del triptófano unidos a γ -cristalina. Se ha propuesto que el fluoróforo en cuestión pudiera ser derivado de histidina (Suárez Sanz et al. 1996b)⁸⁰.

El hecho de encontrar un aumento de la fluorescencia no triptófano con la edad en las distintas subfracciones de HPLC puede indicar, por tanto, un aumento de la agregación proteica en cristalinos no cataratosos a medida que avanza su desarrollo postnatal.

La fluorescencia no triptófano se ha relacionado también con la glicosilación proteica (Pongor et al. 1984)¹³⁵.

V. FLUORESCENCIA DEBIDA AL TRIPTÓFANO

La fluorescencia debida al triptófano es aquella caracterizada por una excitación a 280 nm y una emisión a 345 nm, en relación con una absorbancia a 280 nm (F345/A280). Al igual que en el estudio de la fluorescencia no triptófano, se ha medido para cada una de las subfracciones de HPLC.

La media de la intensidad de fluorescencia debida al triptófano encontrada es mayor cuanto mayor es el peso molecular de la subfracción de HPLC estudiada, con excepción de la cuarta, que es ligeramente mayor que la tercera: 36,89 F/ μ g para la primera subfracción, 30,51 para la segunda, 20,42 para la tercera, 22,95 para la cuarta, 11,56 para la quinta y 11,26 para la sexta

En la subfracción de mayor peso molecular se demuestra un aumento en la media de la intensidad de fluorescencia debida al triptófano en el grupo de más de 65 meses respecto al de 20,5-24 meses.

En la segunda subfracción, por el contrario, aparece una pérdida de triptófano, que es estadísticamente significativa entre el grupo más joven y cualquiera de los otros tres grupos.

El mismo resultado aparece al analizar la tercera y la cuarta subfracción. La pérdida de triptófano se demuestra en los mismos casos: entre el grupo de 0,5-10 meses y los otros tres.

El análisis de las subfracciones de menor peso molecular, 9 y 5 kDa, también apunta una significación estadística en la pérdida de triptófano entre los mismos grupos que la tercera y cuarta subfracción.

Sin embargo, no se ha podido demostrar una pérdida de triptófano estadísticamente significativa entre los tres grupos de más edad en ninguna de las subfracciones segunda a sexta.

La relación de entre intensidad de fluorescencia debida al triptófano y peso molecular de las subfracciones no ha sido encontrada por otros autores al analizar cristalinios cataratosos humanos (Suárez-Sanz et al. 1996b)⁸⁰.

En el mismo grupo de cristalinios sólo se había demostrado una clara pérdida de triptófano en la subfracción de mayor peso molecular, lo cual se había interpretado como una expresión de la independencia de los residuos de triptófano de los constituyentes proteicos en estas fracciones en el entrecruzamiento molecular (Suárez-Sanz et al. 1996b)⁸⁰.

Los aminoácidos aromáticos, especialmente el triptófano, son susceptibles a un ataque fotooxidativo, tanto directo como mediante sustancias sensibilizadas. No se ha relacionado el triptófano con el proceso cataratogénico. A pesar de que el triptófano no parece ser el cromóforo relacionado con la fluorescencia no triptófano, sí podrían serlo productos del metabolismo oxidativo de éste. Numerosas sustancias se han propuesto como agentes que pueden intervenir en el entrecruzamiento molecular, como la bitirosina, el antranílico (Pereira et al. 1994)¹³⁶ y las poliaminas (Roy et al. 1984)¹³⁷.

El no encontrar pérdida de triptófano, sino aumento de fluorescencia debida al triptófano, en la primera subfracción, podría indicar una síntesis de α cristalina en el córtex cristaliniano.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Con la edad, las proteínas cristalinas sufren un proceso de insolubilización que se ve acompañado de agregación entre ellas. Este proceso también se ha descrito en la cataratogénesis. Al estudiar cristalinos porcinos de edades no excesivamente avanzadas, la agregación proteica no ha podido ser demostrada analizando el porcentaje de fracción soluble en agua, presumiblemente porque la agregación avanza de modo lento en estas fases del desarrollo.

2. Por las mismas razones y, al igual que encuentran otros autores, no se han encontrado evidencias de oxidación proteica en los cristalinos estudiados mediante cuantificación de grupos carbonilo.

3. Dentro de la fracción soluble en agua de los cristalinos porcinos se han encontrado que las subfracciones más pesadas (276 y 135 kDa) son las más abundantes, suponiendo más de la mitad del total. Esto se ha visto que es así a lo largo de la vida del cerdo, sin modificaciones significativas de aumento o disminución de las mismas. De las demás subfracciones, la de 62 kDa parece ser mayor en los 10 primeros meses de vida del animal. La de 37 kDa parece ser mayor en las edades intermedias (de 20,5 a 48 meses) respecto a los individuos más jóvenes y mayores. Se ha visto que la de 9 kDa aumenta considerablemente a partir de los 20,5 meses. La subfracción de 5 kDa parece sufrir un descenso progresivo con la edad, con aumento hacia los 65 meses.

El aumento de las subfracciones de menor peso molecular (9 y 5 kDa) parece corresponderse con un aumento de polipéptidos degradados, que se van polimerizando con la edad y forman agregados de alto peso molecular. Esto conduce a la insolubilización.

4. Con la edad se encuentra un aumento progresivo de una fluorescencia inusual para las proteínas denominada fluorescencia no triptófano, que parece relacionarse con productos derivados de la oxidación de aminoácidos aromáticos. Esta fluorescencia es mayor cuanto mayor es el peso molecular de la subfracción estudiada. El componente

fluorescente podría tener un papel en la formación de enlaces cruzados de monómeros de bajo peso molecular para formar agregados de tamaño mayor.

5. Estudiando la fluorescencia debida al triptófano, se ha encontrado una pérdida del mismo a partir de los 20,5 meses en todas las subfracciones estudiadas, salvo en la de mayor peso molecular. El triptófano parece disminuir por ser un aminoácido especialmente susceptible al ataque fotooxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

I. BIBLIOGRAFÍA POR ORDEN DE APARICIÓN

1. Wistow GJ, Piatigorsky J. Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science* 1987;236:1554-1556.
2. Nordmann J. *Biologie du cristallin*. Paris: Masson;1954.
3. Saraux H, Lemasson C, Offret H, Renard G. *Anatomía e Histología del ojo*. Barcelona: Masson;1985:157.
4. Pirie A. Composition of ox lens capsule. *Biochem J* 1951;48:368-371.
5. Sadler TW. *Embriología médica*. México: Editorial Médica Panamericana; 1985:321-322.
6. Spemann H. Über correlation in der Entwicklung des Auges. *Verh Anat Ges* 1901;15:61-79.
7. Grainger RM, Mannion JE, Cook TL Jr, Zygar CA. Defining intermediate stages in cell determination: acquisition of a lens-forming bias in head ectoderm during lens determination. *Dev Genet* 1997;20:246-257.
8. Altmann CR, Chow RL, Lang RA, Hemmati-Brivanlou A. Lens induction by Pax-6 in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1997;185:119-123.
9. McAvoy JW, Chamberlain CG, Iongh RU, Hales AM, Lovicu FJ. Lens development. *Eye* 1999;13:425-437.
10. McAvoy JW. Cytoplasmic processes interconnect lens placode and optic vesicle during eye morphogenesis. *Exp Eye Res* 1980;31:527-534.
11. Silver J, Hugues AFW. The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. *J Morphol* 1973 ;140:159-162.
12. Hamilton WJ, Mossman HW. *Embriología humana. Desarrollo prenatal de la forma y la función*. Buenos Aires: Editorial Inter-médica;1975:523-525.
13. Piatigorsky J. Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features. *Differentiation* 1981;19:134-153.
14. Shinohara T, Piatigorsky J. Quantitation of δ -crystallin messenger RNA during lens induction in chick embryos. *Proc Natl Acad USA* 1976;73:2808-2812.
15. Orts Llorca F. *Anatomía humana*. Barcelona: Editorial Científico-Médica; 1984;II:255-256.

16. Coulombre JL, Coulombre AJ. Lens development: fibre elongation and lens orientation. *Science* 1963;142:1489-1490.
17. McAvoy JW, Chamberlain CG, Iongh RU, Richardson NA, Lovicu FJ. The role of fibroblast growth factor in eye lens development. *Ann NY Acad Sci* 1991;638:256-274.
18. Bettelheim FA, Castoro JA, White O, Chylack LT Jr. Topographic correspondence between total and non-freezable water content and the appearance of cataract in human lenses. *Curr Eye Res* 1986;5:925-932.
19. Zigler JS Jr, Goosey J. Aging of protein molecules: lens crystallins as a model system. *T I B S* 1981;May:133-136.
20. Lieska N, Krotzer K, Yang HY. A reassessment of protein synthesis by lens nuclear fiber cells. *Exp Eye Res* 1992;54:807-811.
21. Groenen PJTA, Grootjans JJ, Lubsen NH, Bloemendal H, de Jong WW. Lys-17 is the amine-donor substrate site for transglutaminase in β A3-crystallin. *J Biol Chem* 1994;269:831-833.
22. Delaye M, Tardieu A. Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature* 1983;302:415-417.
23. Jong WW de, Hendriks W. The eye lens crystallins: ambiguity as evolutionary strategy. *J Mol Evol* 1986;24:121-129.
24. Jong WW de, Leunissen JAM, Leenen PJM, Zweers A, Versteeg M. Dogfish α -crystallin sequences. Comparison with small heat shock proteins and *Schistosoma* egg antigen. *J Biol Chem* 1988;263:5141-5149.
25. Berman ER. *Biochemistry of the eye*. New York: Plenum Press;1991.
26. Cheng HM, Chylack LT Jr, von Saltza I. Supplementing glucose metabolism in human senile cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:812-818.
27. Okuda J, Kawamura M, Didelot S. Anomeric preference in uptake of D-glucose and of D-galactose by rat lenses. *Curr Eye Res* 1987;6:1223-1226.
28. Heyningen R van. Formation of polyols by the lens of the rat with "sugar" cataract. *Nature* 1959;184:194-195.
29. Zelenka PS. Lens lipids. *Curr Eye Res* 1984;3:1337-1359.
30. Alcalá J, Katar M, Rudner G, Maisel H. Human beta crystallins: regional and age related changes. *Curr Eye Res* 1988;7:353-359.

31. Wolff SP, Wang GM, Spector A. Pro-oxidant activation of ocular reductants. 1. Copper and riboflavin stimulate ascorbate oxidation causing lens epithelial cytotoxicity in vitro. *Exp Eye Res* 1987;45:777-789.
32. Mörner CT. Untersuchung der Proteinsubstanzen in den leichtbrechenden Medien des Auges. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 1894;18:61-106.
33. Quax-Jeuken Y, Quax W, van Resns GLM, Meera Khan P, Bloemendal H. Assignment of the human α A crystallin gene CRYA1 to chromosome 21. *Cytogenet Cell Genet* 1985;40:727-728.
34. Ngo JT, Klisak I, Dubin RA, Piatigorsky J, Mohandas T, Sparkes RS, Bateman B. Assignment of the α B-crystallin gene to human chromosome 11. *Genomics* 1989;5:665-669.
35. Wistow GJ, Piatigorsky J. Lens crystallins: The evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* 1988;57:479-504.
36. Cohen LH, Westerhuis LW, Jong WW, Blomendal H. Rat α -crystallin A chain with an insertion of 22 residues. *Eur J Biochem* 1978;89:259-266.
37. Hay RE, Andley UP, Petrash JM. Expression of recombinant bovine γ B-, γ C- and γ D-crystallins and correlation with native proteins. *Exp Eye Res* 1994;58:573-584.
38. Smith JB, Yang Z, Lin P, Zaidi Z, Abbasi A, Russell P. The complete sequence of human lens γ S-crystallin. *Biochem J* 1995;307:407-410.
39. Slingsby C, Clout NJ. Structure of the crystallins. *Eye* 1999;13:395-402.
40. Spector A. The search for a solution to senile cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:130-146.
41. Kramps JA, Jong WW de, Wollensak J, Hoenders HJ. *Biochim Biophys Acta* 1979;533:487-495.
42. Fujii N, Ishibashi Y, Satoh K, Fujino M, Harada K. Simultaneous racemization of aspartic acids at specific sites in α A-crystallin from aged human lens. *Biochim Biophys Acta* 1994;1204:157-163.
43. Ma Z, Hanson SRA, Lampi KJ, David LL, Smith DL, Smith JB. Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry. *Exp Eye Res* 1998;67:21-30.

44. Kelley MJ, David LL, Iwasaki N, Wright J, Shearer TR. α -Crystallin chaperone activity is reduced by calpain II in vitro and in selenite cataract. *J Biol Chem* 1993;268:18844-18849.
45. Siezen RJ, Hoenders HJ. The quaternary structure of bovine α -crystallin. *Eur J Biochem* 1979;96:431-440.
46. Emmons T, Takemoto L. Age-dependent loss of the C-terminal amino acid from α -crystallin. *Exp Eye Res* 1992;51:551-554.
47. Jong WW de, Kleef FSM van, Bloemendal H. Intracellular carboxy-terminal degradation of the α A chain of α -crystallin. *Eur J Biochem* 1974;48:271-276.
48. Kleef FSM van, Willems-Thyssen W, Hoenders HJ. Intracellular degradation of α -crystallin. *Eur J Biochem* 1974;48:563-570.
49. Kleef FSM van, Willems-Thyssen W, Hoenders HJ. Intracellular degradation of α -crystallin subunits. *Eur J Biochem* 1976;66:477-483.
50. Yoshida H, Yumoto N, Tsukahara I, Murachi T. The degradation of α -crystallin at its carboxy-terminal portion by calpain in bovine lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1269-1273.
51. Andersson M, Sjöstrand J, Andersson AK, Andersén B, Karlsson JO. Calpains in lens epithelium from patients with cataract. *Exp Eye Res* 1994;59:359-364.
52. Cahndrasekher G, Cenedella RJ. Calcium activated proteolysis and protein modification in the U18666A cataract. *Exp Eye Res* 1993;57:737-745.
53. David LL, Shearer TR, Shih M. Sequence analysis of lens β -crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem* 1993;268:1937-1940.
54. David LL, Wright JW, Shearer TR. Calpain II induced insolubilization of lens β -crystallin polypeptides may induce cataract. *Biochim Biophys Acta* 1992;1139:210-216.
55. David LL, Azuma M, Shearer TR. Cataract and the acceleration of calpain-induced β -crystallin insolubilization occurring during normal maturation of the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:785-793.
56. David LL, Varnum MD, Lampi KJ, Shearer TR. Calpain II in human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:269-275.

57. David LL, Calvin HI, Fu SCJ. Buthionine sulfoximine induced cataracts in mice contain insolubilized crystallins with calpain II cleavage sites. *Exp Eye Res* 1994;:501-504.
58. Smith JB, Sun Y, Smith DL, Green B. Identification of the post-translational modifications of bovine lens α B-crystallins by mass spectrometry. *Protein Sci* 1992;1:601-608.
59. Kleiman NJ, Chiesa R, Gawinowicz-Kolks MA, Spector A. Phosphorylation of β -crystallin B (β Bp) in the bovine lens. *J Biol Chem* 1988;263:14978-14983.
60. Spector A, Chiesa R, Sredy J, Garner W. cAMP-dependent phosphorylation of bovine lens α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4712-4716.
61. Kantorow M, Piatigorsky J. α -Crystalline / small heat shock protein has autokinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3112-3116.
62. Roquemore EP, Dell A, Morris HR, Panico M, Reason AJ, Savoy LA, Wistow GJ, Zigler JS Jr, Earles BJ, Hart GW. Vertebrate lens α -crystallins are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 1992;267:555-563.
63. Perry RE, Swamy MS, Abraham EC. Progressive changes in lens crystallins glycation and high-molecular mass aggregate formation leading to cataract development in streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res* 1987;44:269-282.
64. Ortwerth BJ, Slight SH, Prabhakaram M, Sun Y, Smith JB. Site-specific glycation of lens crystallin by ascorbic acid. *Biochim Biophys Acta* 1992;117:207-215.
65. Swamy MS, Abraham EC. Lens protein composition, glycation and high molecular weight aggregation in aging rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1693-1701.
66. Swamy MS, Tsai C, Abraham A, Abraham EC. Glycation mediated lens crystallin aggregation and cross-linking by various sugars and sugar phosphates in vitro. *Exp Eye Res* 1993;56:177-185.
67. Qin W, Smith JB, Smith DL. Rates of carbamoylation of specific Lys residues in bovine α -crystallins. *J Biol Chem* 1992;267:26128-26133.
68. Hasan A, Smith JB, Qin W, Smith DJ. The reaction of bovine lens α A-crystallin with aspirin. *Exp Eye Res* 1993;57:29-35.

69. Groenen PJTA, Merck KB, Jong WW de, Bloemendal H. Structure and modifications of the junior chaperone α -crystallin. From lens transparency to molecular pathology. *Eur J Biochem* 1994;225:1-19.
70. Hood BD, Garner B, Truscott RJW. Human lens coloration and aging. *J Biol Chem* 1999;274:32547-32551.
71. Kanwar R, Balasubramanian D. Structure and stability of the dityrosine-linked dimer of γ B-crystallin. *Exp Eye Res* 1999;68:773-784.
72. Fu S, Dean R, Southan M, Truscott R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. *J Biol Chem* 1998;273:28603-28609.
73. Garner B, Vazquez S, Griffith R, Lindner RA, Carver JA, Truscott RJW. Identification of glutathionyl-3-hydroxikinurenine glucoside as a novel fluorophore associated with aging of the human lens. *J Biol Chem* 1999;274:20847-20854.
74. Rose RC, Richer SP, Bode AM. Ocular oxidants and antioxidant protection. *P S E B M* 1988;217:397-407.
75. Varma SD, Kumar S, Richards RD. Light-induced damage to ocular lens cation pump: Prevention by vitamin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3504-3506.
76. Ringvold A. The significance of ascorbate in the aqueous humour protection against UV-A and UV-B. *Exp Eye Res* 1996;62:261-264.
77. Yugay MT, Pereira PC, Leiria F, Mota MC. Oxidative damage to lens membranes induced by metal-catalyzed systems. *Ophthalmic Res* 1996;1:92-96.
78. García Castineiras S, Velázquez S, Martínez P, Torres N. Aqueous humour hydrogen peroxide analysis with dichlorophenol-indophenol. *Exp Eye Res* 1992;55:9-19.
79. Sharma Y, Druger R, Matsuic D, Bassnett S, Beebe DC. Aqueous humour hydrogen peroxide and cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1149-1158.
80. Suárez-Sanz A, Cortés-Valdés A, Cortés-Valdés C, Sánchez-Fernández MJ, Guisasola Zulueta MC, Asensio-Rubio F, García-Barreno P. Modifications of lens proteins induced by a metal-catalyzed oxidative system. *Rev R Acad Cien Exact Fis Nat (Esp)* 1996;90:35-41.
81. Garland D, Russell P, Zigler JS. The oxidative modification of lens proteins. In: Simic MG, Taylor KS, Ward JF, von Sonntag C. *Oxygen radicals in Biology and Medicine*. New York: Plenum Press; 1988;49:347-353.

82. Giblin FJ, Reddan JR, Schrimsher L, Dziedzic DC, Reddy VN. The relative roles of the glutathione redox cycle and catalase in the detoxification of H₂O₂ by cultured rabbit lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 1990;50:795-804.
83. Garland D, Zigler JS Jr, Kinoshita J. *Arch Biochem Biophys* 1986;241:163-172.
84. Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987;262:9895-9901.
85. Davies KJA, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 1987;262:9902-9907.
86. Davies KJA, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* 1987;262:9908-9913.
87. Davies KJA, Lin SW, Pacifici RE. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J Biol Chem* 1987;262:9914-9920.
88. Babizhayev MA. Failure to withstand oxidative stress induced by phospholipid hydroperoxides as a possible cause of the lens opacities in systemic diseases and ageing. *BBA Mol Basis Dis* 1996;1315:87-99.
89. Varma SD, Devamanoharan PS. Oxidative denaturation of lens protein: prevention by pyruvate. *Ophthalmic Res* 1995;27:18-22.
90. Goralka M, Harned J, Grimes AM, Fleisher LN, McGahan MC. Mechanisms by which ascorbic acid increases ferritin levels in cultured lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 1997;64:413-421.
91. Varma SD, Devamanoharan PS. Peroxide damage to rat lens in vitro: protective effect of dehydroascorbate. *J Ocul Pharmacol Therapeut* 1995;11:543-551.
92. Bendich A, Langseth L. The health effects of vitamin C supplementation: a review. *J Am Coll Nutr* 1995;14:124-136.
93. Giangiacoimo A, Olesen PR, Ortwerth BJ. Ascorbic acid and glucose oxidation by ultraviolet A-generated oxygen free radicals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1549-1556.
94. Bando M, Obazawa H. Activities of ascorbate free radical reductase and H₂O₂-dependent NADH oxidation in senile cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 1990;50:779-786.

95. Kasuya M, Itoi M, Kobayashi S, Sunaga S, Suzuki KT. Changes in glutathione and taurine concentrations in lenses of rat eyes induced by galactose-cataract formation or ageing. *Exp Eye Res* 1992;54:49-53.
96. Nagasawa HT, Cohen JF, Holleschau Am, Rathbun WB. Augmentation of human and rat lenticular glutathione in vitro by prodrugs of gamma-l-glutamyl-cysteine. *J Med Chem* 1996;39:1676-1681.
97. Horwitz J, Bova MP, Ding LL, Haley DA, Stewart PL. Lens α -crystallin: function and structure. *Eye* 1999;13:403-408.
98. Wistow GJ. Domain structure and evolution in α -crystallins and small heat-shock proteins. *FEBS Lett* 1985;181:1-6.
99. Bindels JG, Siezen RJ, Hoenders HJ. Effect of elevated temperatures on the structure of alpha-crystallin from calf lens. *Ophthalmic Res* 1979;11:441-452.
100. Siezen RJ, Bindels JG, Hoenders HJ. The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Effects of variation in alkaline pH, ionic strength, temperature and calcium concentration. *Eur J Biochem* 1980;111:435-444.
101. Augusteyn RC, Koretz JF. A possible structure for alpha-crystallin. *FEBS Lett* 1987;222:1-5.
102. Walsh MT, Sen AC, Chakrabarti B. Micellar subunit assembly in a three-layer model of oligomeric α -crystallin. *J Biol Chem* 1991;266:20079-20084.
103. Tardieu A, Laporte D, Licinio P, Krop B, Delaye M. Calf lens alpha-crystallin quaternary structure. A three-layer tetrahedral model. *J Mol Biol* 1986;192:711-724.
104. Wistow GJ. A possible quaternary structure for α -crystallins and small heat-shock proteins. *Exp Eye Res* 1993;56:729-732.
105. Jong WW de, Lubsen NH, Kraft HJ. Molecular evolution of the eye lens. *Prog Ret Eye Res* 1994;13:391-442.
106. Slingsby C, Bateman OA. Formation and crytalization of the eye lens heterodimer β B2- β B3-crystallin. *Exp Eye Res* 1994;58:761-764.
107. Slingsby C, Norledge B, Simpson A, Bateman OA, Wright G, Driessen HPC. X-ray diffraction and structure of the crystallins. *Prog Ret Eye Res* 1997;16:3-29.
108. Ingolia TD, Craig EA. Four small heat-shock proteins are related to each other and to mammalian α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2360-2364.

109. Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, Schäfer R, Aoyama A. α B-crystallin is a small heat-shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3652-3656.
110. Das KP, Choo-Smith LP, Petrash JM, Surewicz WK. Insight into the secondary structure of non-native proteins bound to a molecular chaperone alpha-crystallin. An isotope-edited infrared spectroscopic study. *J Biol Chem* 1999;274:33209-33212.
111. Lee JS, Liao JH, Wu SH, Chiou SH. Alpha-Crystallin acting as a molecular chaperonin against photodamage by UV irradiation. *J Protein Chem* 1997;16:283-289.
112. Boyle D, Takemoto L. Characterization of the α - γ and α - β complex: evidence for an in vivo functional role of α -crystallin as a mollecular chaperone. *Exp Eye Res* 1994;58:9-16.
113. Muchowski PJ, Valdez MM, Clark JI. AlphaB-crystallin selectively targets intermediate filament proteins during thermal stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:951-958.
114. Perng MD, Cairns L, van den Ijssel P, Prescott A, Hutcheson AM, Quinlan RA. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J Cell Sci* 1999;112:2099-2112.
115. Datta SA, Rao CM. Differential Temperature-dependent Chaperone-like Activity of alphaA- and alphaB-crystallin Homoaggregates. *J Biol Chem* 1999;274:34773-34778.
116. Muchowski PJ, Hays LG, Yates JR 3rd, Clark JI. ATP and the core "alpha-Crystallin" domain of the small heat-shock protein alphaB-crystallin. *J Biol Chem* 1999;274:30190-30195.
117. Cherian-Shaw M, Smith JB, Jiang XY, Abraham EC. Intrapolypeptide disulfides in human alphaA-crystallin and their effect on chaperone-like function. *Mol Cell Biochem* 1999;199:163-167.
118. Crabbe MJC, Goode D. α -Crystallin: chaperoning and aggregation. *Biochem J* 1994;297:653-654.
119. Lindner RA, Kapur A, Mariani M, Titmuss SJ, Carver JA. Structural alterations of alpha-crystallin during its chaperone action. *Eur J Biochem* 1998;258:170-183.
120. Derham BK, Harding JJ. Alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:463-509.

121. Raman B, Rao CM. Chaperone-like activity and quaternary structure of α -crystallin. *J Biol Chem* 1994;269:27264-27268.
122. Clark JI, Huang QL. Modulation of the chaperone-like activity of bovine α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15185-15189.
123. Clark R, Zigman S, Lerman S. Studies on the structural proteins of the human lens. *Exp Eye Res* 1969;8:172-182.
124. Harding JJ, Dilley KJ. Structural proteins of the mammalian lens: a review with emphasis on changes in development, aging and cataract. *Exp Eye Res* 1976;22:1-73.
125. Suárez-Sanz A, Cortés-Valdés A, Cortés-Valdés C, Guisasola Zulueta MC, Sánchez-Fernández MJ, García-Barreno P. Oxidative processes in cataractous lenses: age-dependent relationship between increasing fluorescence and aggregation. *Rev R Acad Cien Exact Fis Nat (Esp)* 1996;90:29-34.
126. Takemoto K, Takemoto D, Brown G, Takehana M, Smith J, Horwitz J. Cleavage from the N-terminal region of β Bp crystallin during the aging of the human lens. *Exp Eye Res* 1987;45:385-392.
127. Alcalá J, Cenedella RJ, Katar M. Limited proteolysis of MP26 in lens fiber plasma membranes of the U18666A-induced cataracts in rats. *Curr Eye Res* 1985;4:1001-1005.
128. Yu NT, Cai MZ, Ho DJY, Kuck JFR Jr. Automated laser-scanning-microbeam fluorescence / Raman image analysis of human lens with multichannel detection: evidence for metabolic production of a green fluorophor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;82:7965-7968.
129. Srivastava OP. Age-related increase in concentration and aggregation of degraded polypeptides in human lenses. *Exp Eye Res* 1988;47:525-543.
130. Bustad LK. *Animal, aging and the aged*. Minneapolis: University of Minnesota Press; 1980: 13.
131. Oliver CN, Ahn B, Moerman E, Goldstein S, Stadman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 1987;262:5488-5491.
132. Garner MH, Spector A. Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:1274.

133. Bessems GJH, Keizer E, Wollensak J, Hoenders HJ. Non-tryptophan fluorescence of crystallins from normal and cataractous human lenses. *Investt Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1157-1163.
134. Bessems GJH, Hoenders HJ. Distribution of aromatic and fluorescent compounds within single human lenses. *Exp Eye Res* 1987;44:817-824.
135. Pongor S, Ulrich PC, Bencsath FA, Cerami A. Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2684.
136. Pereira PC, Ramalho JS, Faro CJ, Mota MC. Age-related changes in normal and cataractous human lens crystallins, separated by fast-performance liquid chromatography. *Ophthalmic Res* 1994;26:149-157.
137. Roy D, Dillon J, Wada E, Chaney W, Spector A. Non-disulfide polymerization of gamma- and beta- crystallins in the human lens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:8278-8281.

II. BIBLIOGRAFÍA POR ORDEN ALFABÉTICO

- Alcalá J, Cenedella RJ, Katar M. Limited proteolysis of MP26 in lens fiber plasma membranes of the U18666A-induced cataracts in rats. *Curr Eye Res* 1985;4:1001-1005.
- Alcalá J, Katar M, Rudner G, Maisel H. Human beta crystallins: regional and age related changes. *Curr Eye Res* 1988;7:353-359.
- Altmann CR, Chow RL, Lang RA, Hemmati-Brivanlou A. Lens induction by Pax-6 in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1997;185:119-123.
- Andersson M, Sjöstrand J, Andersson AK, Andersén B, Karlsson JO. Calpains in lens epithelium from patients with cataract. *Exp Eye Res* 1994;59:359-364.
- Augusteyn RC, Koretz JF. A possible role for alpha-crystallin. *FEBS Lett* 1987;222:1-5.
- Babizhayev MA. Failure to withstand oxidative stress induced by phospholipid hydroperoxides as a possible cause of the lens opacities in systemic diseases and ageing. *BBA Mol Basis Dis* 1996;1315:87-99.
- Bando M, Obazawa H. Activities of ascorbate free radical reductase and H₂O₂-dependent NADH oxidation in senile cataractous human lenses. *Exp Eye Res* 1990;50:779-786.
- Bendich A, Langseth L. The health effects of vitamin C supplementation: a review. *J Am Coll Nutr* 1995;14:124-136.
- Berman ER. *Biochemistry of the eye*. New York: Plenum Press; 1991.
- Bessems GJH, Keizer E, Wollensak J, Hoenders HJ. Non-tryptophan fluorescence of crystallins from normal and cataractous human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1157-1163.
- Bessems GJH, Hoenders HJ. Distribution of aromatic and fluorescent compounds within single human lenses. *Exp Eye Res* 1987;44:817-824.
- Bettelheim FA, Castoro JA, White O, Chylack LT Jr. Topographic correspondence between total and non-freezable water content and the appearance of cataract in human lenses. *Curr Eye Res* 1986;5:925-932.
- Bindels JG, Siezen RJ, Hoenders HJ. Effect of elevated temperatures on the structure of alpha-crystallin from calf lens. *Ophthalmic Res* 1979;11:441-452.

- Boyle D, Takemoto L. Characterization of the α - γ and α - β complex: evidence for an in vivo functional role of α -crystallin as a mollecular chaperone. *Exp Eye Res* 1994;58:9-16.
- Bustad LK. *Animal, aging and the aged*. Minneapolis: University of Minnesota Press; 1980: 13.
- Cahndrasekher G, Cenedella RJ. Calcium activated proteolysis and protein modification in the U18666A cataract. *Exp Eye Res* 1993;57:737-745.
- Cheng HM, Chylack LT Jr, von Saltza I. Supplementing glucose metabolism in human senile cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:812-818.
- Cherian-Shaw M, Smith JB, Jiang XY, Abraham EC. Intrapolypeptide disulfides in human alphaA-crystallin and their effect on chaperone-like function. *Mol Cell Biochem* 1999;199:163-167.
- Clark JI, Huang QL. Modulation of the chaperone-like activity of bovine α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15185-15189.
- Clark R, Zigman S, Lerman S. Studies on the structural proteins of the human lens. *Exp Eye Res* 1969;8:172-182.
- Cohen LH, Westerhuis LW, Jong WW de, Blomendal H. Rat α -crystallin A chain with an insertion of 22 residues. *Eur J Biochem* 1978;89:259-266.
- Coulombre JL, Coulombre AJ. Lens development: fibre elongation and lens orientation. *Science* 1963;142:1489-1490.
- Crabbe MJC, Goode D. α -Crystallin: chaperoning and aggregation. *Biochem J* 1994;297:653-654.
- Das KP, Choo-Smith LP, Petrash JM, Surewicz WK. Insight into the secondary structure of non-native proteins bound to a molecular chaperone alpha-crystallin. An isotope-edited infrared spectroscopic study. *J Biol Chem* 1999;274:33209-33212.
- Datta SA, Rao CM. Differential Temperature-dependent Chaperone-like Activity of alphaA- and alphaB-crystallin Homoaggregates. *J Biol Chem* 1999;274:34773-34778.
- David LL, Varnum MD, Lampi KJ, Shearer TR. Calpain II in human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:269-275.
- David LL, Wright JW, Shearer TR. Calpain II induced insolubilization of lens β -crystallin polypeptides may induce cataract. *Biochim Biophys Acta* 1992;1139:210-216.

- David LL, Shearer TR, Shih M. Sequence analysis of lens β -crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem* 1993;268:1937-1940.
- David LL, Azuma M, Shearer TR. Cataract and the acceleration of calpain-induced β -crystallin insolubilization occurring during normal maturation of the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:785-793.
- David LL, Calvin HI, Fu SCJ. Buthionine sulfoximine induced cataracts in mice contain insolubilized crystallins with calpain II cleavage sites. *Exp Eye Res* 1994;59:501-504.
- Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987;262:9895-9901.
- Davies KJA, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 1987;262:9902-9907.
- Davies KJA, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* 1987;262:9908-9913.
- Davies KJA, Lin SW, Pacifici RE. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J Biol Chem* 1987;262:9914-9920.
- Delaye M, Tardieu A. Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature* 1983;302:415-417.
- Derham BK, Harding JJ. Alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:463-509.
- Emmons T, Takemoto L. Age-dependent loss of the C-terminal amino acid from α -crystallin. *Exp Eye Res* 1992;51:551-554.
- Fu S, Dean R, Southan M, Truscott R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. *J Biol Chem* 1998;273:28603-28609.
- Fujii N, Ishibashi Y, Satoh K, Fujino M, Harada K. Simultaneous racemization of aspartic acids at specific sites in α A-crystallin from aged human lens. *Biochim Biophys Acta* 1994;1204:157-163.
- García Castineiras S, Velázquez S, Martínez P, Torres N. Aqueous humour hydrogen peroxide analysis with dichlorophenol-indophenol. *Exp Eye Res* 1992;55:9-19.
- Garland D, Zigler JS Jr, Kinoshita J. *Arch Biochem Biophys* 1986;241:163-172.

- Garland D, Russell P, Zigler JS. The oxidative modification of lens proteins. In: Simic MG, Taylor KS, Ward JF, von Soutag C. Oxygen radicals in Biology and Medicine. New York: Plenum Press; 1988;49:347-353.
- Garner MH, Spector A. Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:1274.
- Garner B, Vazquez S, Griffith R, Lindner RA, Carver JA, Truscott RJW. Identification of glutathionyl-3-hydroxikinurenine glucoside as a novel fluorophore associated with aging of the human lens. J Biol Chem 1999;274:20847-20854.
- Giangiacomo A, Olesen PR, Ortwerth BJ. Ascorbic acid and glucose oxidation by ultraviolet A-generated oxygen free radicals. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37:1549-1556.
- Giblin FJ, Reddan JR, Schirmscher L, Dziedzic DC, Reddy VN. The relative roles of the glutathione redox cycle and catalase in the detoxification of H₂O₂ by cultured rabbit lens epithelial cells. Exp Eye Res 1990;50:795-804.
- Goralka M, Harned J, Grimes AM, Fleisher LN, McGahan MC. Mechanisms by which ascorbic acid increases ferritin levels in cultured lens epithelial cells. Exp Eye Res 1997;64:413-421.
- Grainger RM, Mannion JE, Cook TL Jr, Zygar CA. Defining intermediate stages in cell determination: acquisition of a lens-forming bias in head ectoderm during lens determination. Dev Genet 1997;20:246-257.
- Groenen PJTA, Grootjans JJ, Lubsen NH, Bloemendal H, de Jong WW. Lys-17 is the amine-donor substrate site for transglutaminase in β A3-crystallin. J Biol Chem 1994;269:831-833.
- Groenen PJTA, Merck KB, Jong WW de, Bloemendal H. Structure and modifications of the junior chaperone α -crystallin. From lens transparency to molecular pathology. Eur J Biochem 1994;225:1-19.
- Hamilton WJ, Mossman HW. Embriología humana. Desarrollo prenatal de la forma y la función. Buenos Aires: Editorial Inter-médica;1975:523-525.
- Harding JJ, Dilley KJ. Structural proteins of the mammalian lens: a review with emphasis on changes in development, aging and cataract. Exp Eye Res 1976;22:1-73.
- Hasan A, Smith JB, Qin W, Smith DJ. The reaction of bovine lens α A-crystallin with aspirin. Exp Eye Res 1993;57:29-35.

- Hay RE, Andley UP, Petrash JM. Expression of recombinant bovine γ B-, γ C- and γ D-crystallins and correlation with native proteins. *Exp Eye Res* 1994;58:573-584.
- Heyningen R van. Formation of polyols by the lens of the rat with “sugar” cataract. *Nature* 1959;184:194-195.
- Hood BD, Garner B, Truscott RJW. Human lens coloration and aging. *J Biol Chem* 1999;274:32547-32551.
- Horwitz J, Bova MP, Ding LL, Haley DA, Stewart PL. Lens α -crystallin: function and structure. *Eye* 1999;13:403-408.
- Ingolia TD, Craig EA. Four small heat-shock proteins are related to each other and to mammalian α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2360-2364.
- Jong WW de, Hendriks W. The eye lens crystallins: ambiguity as evolutionary strategy. *J Mol Evol* 1986;24:121-129.
- Jong WW de, Leunissen JAM, Leenen PJM, Zweers A, Versteeg M. Dogfish α -crystallin sequences. Comparison with small heat shock proteins and *Schistosoma* egg antigen. *J Biol Chem* 1988;263:5141-5149.
- Jong WW de, Lubsen NH, Kraft HJ. Molecular evolution of the eye lens. *Prog Ret Eye Res* 1994;13:391-442.
- Jong WW de, Kleef FSM van, Bloemendal H. Intracellular carboxy-terminal degradation of the α A chain of α -crystallin. *Eur J Biochem* 1974;48:271-276.
- Kantorow M, Piatigorsky J. α -Crystalline / small heat shock protein has autokinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3112-3116.
- Kanwar R, Balasubramanian D. Structure and stability of the dityrosine-linked dimer of γ B-crystallin. *Exp Eye Res* 1999;68:773-784.
- Kasuya M, Itoi M, Kobayashi S, Sunaga S, Suzuki KT. Changes in glutathione and taurine concentrations in lenses of rat eyes induced by galactose-cataract formation or ageing. *Exp Eye Res* 1992;54:49-53.
- Kelley MJ, David LL, Iwasaki N, Wright J, Shearer TR. α -Crystallin chaperone activity is reduced by calpain II in vitro and in selenite cataract. *J Biol Chem* 1993;268:18844-18849.
- Kleef FSM van, Willems-Thyssen W, Hoenders HJ. Intracellular degradation of α -crystallin. *Eur J Biochem* 1974;48:563-570.

- Kleef FSM van, Willems-Thyssen W, Hoenders HJ. Intracellular degradation of α -crystallin subunits. *Eur J Biochem* 1976;66:477-483.
- Kleiman NJ, Chiesa R, Gawinowicz-Kolks MA, Spector A. Phosphorylation of β -crystallin B (β Bp) in the bovine lens. *J Biol Chem* 1988;263:14978-14983.
- Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, Schäfer R, Aoyama A. α B-crystallin is a small heat-shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3652-3656.
- Kramps JA, Jong WW de, Wollensak J, Hoenders HJ. *Biochim Biophys Acta* 1979;533:487-495.
- Lee JS, Liao JH, Wu SH, Chiou SH. Alpha-Crystallin acting as a molecular chaperonin against photodamage by UV irradiation. *J Protein Chem* 1997;16:283-289.
- Lieska N, Krotzer K, Yang HY. A reassessment of protein synthesis by lens nuclear fiber cells. *Exp Eye Res* 1992;54:807-811.
- Lindner RA, Kapur A, Mariani M, Titmuss SJ, Carver JA. Structural alterations of alpha-crystallin during its chaperone action. *Eur J Biochem* 1998;258:170-183.
- Ma Z, Hanson SRA, Lampi KJ, David LL, Smith DL, Smith JB. Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry. *Exp Eye Res* 1998;67:21-30.
- McAvoy JW. Cytoplasmic processes interconnect lens placode and optic vesicle during eye morphogenesis. *Exp Eye Res* 1980;31:527-534.
- McAvoy JW, Chamberlain CG, Iongh RU, Richardson NA, Lovicu FJ. The role of fibroblast growth factor in eye lens development. *Ann NY Acad Sci* 1991;638:256-274.
- McAvoy JW, Chamberlain CG, Iongh RU, Hales AM, Lovicu FJ. Lens development. *Eye* 1999;13:425-437.
- Mörner CT. Untersuchung der Proteinsubstanzen in den leichtbrechenden Medien des Auges. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 1894;18:61-106.
- Muchowski PJ, Valdez MM, Clark JI. AlphaB-crystallin selectively targets intermediate filament proteins during thermal stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:951-958.
- Muchowski PJ, Hays LG, Yates JR 3rd, Clark JI. ATP and the core "alpha-Crystallin" domain of the small heat-shock protein alphaB-crystallin. *J Biol Chem* 1999;274:30190-30195.

- Nagasawa HT, Cohen JF, Holleschau Am, Rathbun WB. Augmentation of human and rat lenticular glutathione in vitro by prodrugs of gamma-l-glutamyl-cysteine. *J Med Chem* 1996;39:1676-1681.
- Ngo JT, Klisak I, Dubin RA, Piatigorsky J, Mohandas T, Sparkes RS, Bateman B. Assignment of the α B-crystallin gene to human chromosome 11. *Genomics* 1989;5:665-669.
- Nordmann J. *Biologie du cristallin*. Paris: Masson;1954.
- Okuda J, Kawamura M, Didelot S. Anomeric preference in uptake of D-glucose and of D-galactose by rat lenses. *Curr Eye Res* 1987;6:1223-1226.
- Oliver CN, Ahn B, Moerman E, Goldstein S, Stadman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 1987;262:5488-5491.
- Orts Llorca F. *Anatomía humana*. Barcelona: Editorial Científico-Médica; 1984;II:255-256.
- Ortwerth BJ, Slight SH, Prabhakaram M, Sun Y, Smith JB. Site-specific glycation of lens crystallin by ascorbic acid. *Biochim Biophys Acta* 1992;117:207-215.
- Pereira PC, Ramalho JS, Faro CJ, Mota MC. Age-related changes in normal and cataractous human lens crystallins, separated by fast-performance liquid chromatography. *Ophthalmic Res* 1994;26:149-157.
- Perng MD, Cairns L, van den Ijssel P, Prescott A, Hutcheson AM, Quinlan RA. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J Cell Sci* 1999;112:2099-2112.
- Perry RE, Swammy MS, Abraham EC. Progressive changes in lens crystallins glycation and high-molecular mass aggregate formation leading to cataract development in streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res* 1987;44:269-282.
- Piatigorsky J. Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features. *Differentiation* 1981;19:134-153.
- Pirie A. Composition of ox lens capsule. *Biochem J* 1951;48:368-371.
- Pongor S, Ulrich PC, Bencsath FA, Cerami A. Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2684.
- Qin W, Smith JB, Smith DL. Rates of carbamylation of specific Lys residues in bovine α -crystallins. *J Biol Chem* 1992;267:26128-26133.

- Quax-Jeuken Y, Quax W, van Resns GLM, Meera Khan P, Bloemendal H. Assignment of the human α A crystallin gene CRYA1 to chromosome 21. *Cytogenet Cell Genet* 1985;40:727-728.
- Raman B, Rao CM. Chaperone-like activity and quaternary structure of α -crystallin. *J Biol Chem* 1994;269:27264-27268.
- Ringvold A. The significance of ascorbate in the aqueous humour protection against UV-A and UV-B. *Exp Eye Res* 1996;62:261-264.
- Roquemore EP, Dell A, Morris HR, Panico M, Reason AJ, Savoy LA, Wistow GJ, Zigler JS Jr, Earles BJ, Hart GW. Vertebrate lens α -crystallins are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 1992;267:555-563.
- Rose RC, Richer SP, Bode AM. Ocular oxidants and antioxidant protection. *P S E B M* 1988;217:397-407.
- Roy D, Dillon J, Wada E, Chaney W, Spector A. Non-disulfide polymerization of gamma- and beta- crystallins in the human lens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:8278-8281.
- Sadler TW. *Embriología médica*. México: Editorial Médica Panamericana; 1985:321-322.
- Saraux H, Lemasson C, Offret H, Renard G. *Anatomía e Histología del ojo*. Barcelona: Masson;1985:157.
- Sharma Y, Druger R, Matsuic D, Bassnett S, Beebe DC. Aqueous humour hydrogen peroxide and cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1149-1158.
- Shinohara T, Piatigorsky J. Quantitation of δ -crystallin messenger RNA during lens induction in chick embryos. *Proc Natl Acad USA* 1976;73:2808-2812.
- Siezen RJ, Hoenders HJ. The quaternary structure of bovine α -crystallin. *Eur J Biochem* 1979;96:431-440.
- Siezen RJ, Bindels JG, Hoenders HJ. The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Effects of variation in alkaline pH, ionic strength, temperature and calcium concentration. *Eur J Biochem* 1980;111:435-444.
- Silver J, Hugues AFW. The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. *J Morphol* 1973 ;140:159-162.
- Slingsby C, Bateman OA. Formation and crytalization of the eye lens heterodimer β B2- β B3-crystallin. *Exp Eye Res* 1994;58:761-764.

- Slingsby C, Norledge B, Simpson A, Bateman OA, Wright G, Driessen HPC. X-ray diffraction and structure of the crystallins. *Prog Ret Eye Res* 1997;16:3-29.
- Slingsby C, Clout NJ. Structure of the crystallins. *Eye* 1999;13:395-402.
- Smith JB, Sun Y, Smith DL, Green B. Identification of the post-translational modifications of bovine lens α B-crystallins by mass spectrometry. *Protein Sci* 1992;1:601-608.
- Smith JB, Yang Z, Lin P, Zaidi Z, Abbasi A, Russell P. The complete sequence of human lens γ S-crystallin. *Biochem J* 1995;307:407-410.
- Spector A. The search for a solution to senile cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:130-146.
- Spector A, Chiesa R, Sredy J, Garner W. cAMP-dependent phosphorylation of bovine lens α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4712-4716.
- Spemann H. Über correlation in der Entwicklung des Auges. *Verh Anat Ges* 1901;15:61-79.
- Srivastava OP. Age-related increase in concentration and aggregation of degraded polypeptides in human lenses. *Exp Eye Res* 1988;47:525-543.
- Suárez-Sanz A, Cortés-Valdés A, Cortés-Valdés C, Guisasola Zulueta MC, Sánchez-Fernández MJ, García-Barreno P. Oxidative processes in cataractous lenses: age-dependent relationship between increasing fluorescence and aggregation. *Rev R Acad Cien Exact Fis Nat (Esp)* 1996;90:29-34.
- Suárez-Sanz A, Cortés-Valdés A, Cortés-Valdés C, Sánchez-Fernández MJ, Guisasola Zulueta MC, Asensio-Rubio F, García-Barreno P. Modifications of lens proteins induced by a metal-catalyzed oxidative system. *Rev R Acad Cien Exact Fis Nat (Esp)* 1996;90:35-41.
- Swamy MS, Abraham EC. Lens protein composition, glycation and high molecular weight aggregation in aging rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1693-1701.
- Swamy MS, Tsai C, Abraham A, Abraham EC. Glycation mediated lens crystallin aggregation and cross-linking by various sugars and sugar phosphates in vitro. *Exp Eye Res* 1993;56:177-185.
- Takemoto K, Takemoto D, Brown G, Takehana M, Smith J, Horwitz J. Cleavage from the N-terminal region of β Bp crystallin during the aging of the human lens. *Exp Eye Res* 1987;45:385-392.

- Tardieu A, Laporte D, Licinio P, Krop B, Delaye M. Calf lens alpha-crystallin quaternary structure. A three-layer tetrahedral model. *J Mol Biol* 1986;192:711-724.
- Varma SD, Kumar S, Richards RD. Light-induced damage to ocular lens cation pump: Prevention by vitamin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3504-3506.
- Varma SD, Devamanoharan PS. Peroxide damage to rat lens in vitro: protective effect of dehydroascorbate. *J Ocul Pharmacol Therapeut* 1995;11:543-551.
- Varma SD, Devamanoharan PS. Oxidative denaturation of lens protein: prevention by pyruvate. *Ophthalmic Res* 1995;27:18-22.
- Walsh MT, Sen AC, Chakrabarti B. Micellar subunit assembly in a three-layer model of oligomeric α -crystallin. *J Biol Chem* 1991;266:20079-20084.
- Wistow GJ. Domain structure and evolution in α -crystallins and small heat-shock proteins. *FEBS Lett* 1985;181:1-6.
- Wistow GJ, Piatigorsky J. Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science* 1987;236:1554-1556.
- Wistow GJ, Piatigorsky J. Lens crystallins: The evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* 1988;57:479-504.
- Wistow GJ. A possible quaternary structure for α -crystallins and small heat-shock proteins. *Exp Eye Res* 1993;56:729-732.
- Wolff SP, Wang GM, Spector A. Pro-oxidant activation of ocular reductants. 1. Copper and riboflavin stimulate ascorbate oxidation causing lens epithelial cytotoxicity in vitro. *Exp Eye Res* 1987;45:777-789.
- Yoshida H, Yumoto N, Tsukahara I, Murachi T. The degradation of α -crystallin at its carboxy-terminal portion by calpain in bovine lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1269-1273.
- Yu NT, Cai MZ, Ho DJY, Kuck JFR Jr. Automated laser-scanning-microbeam fluorescence / Raman image analysis of human lens with multichannel detection: evidence for metabolic production of a green fluorophor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;82:7965-7968.
- Yugay MT, Pereira PC, Leiria F, Mota MC. Oxidative damage to lens membranes induced by metal-catalyzed systems. *Ophthalmic Res* 1996;1:92-96.
- Zelenka PS. Lens lipids. *Curr Eye Res* 1984;3:1337-1359.
- Zigler JS Jr, Goosey J. Aging of protein molecules: lens crystallins as a model system. *T I B S* 1981;May:133-136.