



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO

FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ, IAP

**“POLIMORFISMO rs13181 DEL GEN ERCC2 EN PACIENTES
CON CATARATA SENIL”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO OFTALMÓLOGO

PRESENTA:

DR. CLAUDIO EMMANUEL HERNÁNDEZ GUZMÁN

ASESORES DE TESIS

DR. OSCAR GUERRERO BERGER

DR. HÉCTOR JAVIER PÉREZ CANO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. ALEJANDRO BABAYÁN SOSA

PROFESOR TITULAR ANTE LA UNAM

DR. OSCAR BACA LOZADA

PROFESOR ADJUNTO

DRA. ADRIANA SAUCEDO CASTILLO

PROFESOR ADJUNTO / JEFE DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACIÓN

DR. JAIME LOZANO ALCÁZAR

DIRECTOR MÉDICO

DRA. STEPHANIE VOORDUIN RAMOS

SUBJEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR. OSCAR GUERRERO BERGER

ASESOR DE TESIS

DR. HÉCTOR JAVIER PÉREZ CANO

ASESOR DE TESIS

Agradecimientos

A Dios por siempre estar conmigo.

A mi mamá por los sueños compartidos, espero que se sienta orgullosa de mí.

A mis hermanos por su amor y apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos de posgrado por su apoyo constante y por la amistad brindada en estos tres años.

A mi novia Martha, que estuvo a mi lado en los momentos más difíciles. Tus palabras de aliento y tu energía hicieron que no me rindiera nunca. Me ayudaste hasta donde te era posible incluso más que eso.

A mi mejor amigo Arturo por toda la paciencia y su gran ayuda siempre, por sus consejos y tiempo recibido en cada paso que doy.

A la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz y a todo el grupo humano que ahí labora, que me hicieron sentir parte de una familia.

A mis asesores por creer desde el principio en este proyecto.

A mis queridos docentes y algunos de ellos amigos, por la paciencia y sabiduría compartida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad brindada de crecer como profesional.

Y a todos quienes intervinieron de una u otra manera durante estos tres años.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Definición y Epidemiología	3
2.2	Etiología y Factores de riesgo	4
2.3	Fisiopatología	5
2.3.1	Fisiología del cristalino	5
2.3.2	Agregación de proteínas	6
2.3.3	Mecanismos relacionados con el transporte celular	8
2.3.4	Estrés oxidativo	9
2.3.5	Alteraciones en la reparación del ADN	11
3	PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	17
3.1	Planteamiento del problema	17
3.2	Justificación	17
3.3	Pregunta de investigación	17
3.4	Hipótesis	17
3.5	Objetivos	18
3.5.1	Objetivo general	18
3.5.2	Objetivos específicos	18
4	MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1	Grupo de estudio	19
4.1.1	Criterios de inclusión	19
4.1.2	Criterios de exclusión	19
4.2	Grupo control	19
4.2.1	Criterios de inclusión	19
4.2.2	Criterios de exclusión	20
4.2.3	Criterios de eliminación	20
4.3	Aspectos éticos y técnicos	20
4.4	Análisis estadístico	21
5	RESULTADOS	22
5.1	Frecuencia genotípica	23
5.2	Frecuencia alélica	24
6	DISCUSIÓN	26
7	CONCLUSIONES	31
8	ANEXOS	32
9	REFERENCIAS	34

1. RESUMEN

Introducción: La catarata senil es la causa número uno de discapacidad visual y ceguera reversible, el único tratamiento definitivo es la cirugía. Además de los factores ambientales, se han asociado variantes genéticas en el desarrollo de ésta.

Objetivo: Identificar la presencia del polimorfismo rs13181 en el gen ERCC2 en pacientes con catarata senil.

Material y métodos: Se obtuvo ADN de sangre completa de pacientes y sujetos control para el análisis de la región rs13181 por PCR y secuenciación nucleotídica. Se realizó análisis comparativo usando la prueba de Chi cuadrada (intervalo de confianza del 95%) y calculando la razón de momios para frecuencia genotípica y frecuencia alélica (GraphPad Prism V5.0).

Resultados: Se analizaron 52 muestras de pacientes con catarata senil y 31 sujetos control. El promedio de edad 73 y 68 años respectivamente. El genotipo AA se detectó en el 11% y 53%; AC en 86% y 40%; CC en el 3% y 7% de los controles y pacientes respectivamente. La frecuencia genotípica presentó una diferencia estadísticamente significativa entre AA y AC ($p < 0.001$). El alelo A fue más común en el grupo de pacientes (73% contra 54%).

Conclusión: El polimorfismo rs13181 en el gen ERCC2 (alelo A) es más frecuente en pacientes con catarata senil, la razón de momios indica que tienen 2.3 veces más riesgo a desarrollarla y se sugiere que el alelo C es un posible protector con odds ratio de 0.43.

Palabras clave: Catarata senil. Polimorfismo. Ceguera. Genotipo. PCR. Alelo.

ABSTRACT

Introduction: Senile cataract is the number one cause of visual impairment and reversible blindness, the only definitive treatment is surgery. In addition to environmental factors, genetic variants have been associated in its development.

Objective: To identify the presence of the rs13181 polymorphism in the ERCC2 gene in patients with senile cataract.

Material and methods: DNA was obtained from whole blood of cataract patients and control subjects for the analysis of the rs13181 region by PCR and nucleotide sequencing. Comparative analysis was performed using the Chi square test (95% confidence interval) and calculating the odds ratio for genotype frequency and allelic frequency (GraphPad Prism V5.0).

Results: 52 samples from patients with senile cataract and 31 control subjects were analyzed. The average age was 73 and 68 years respectively. The AA genotype was detected in 11% and 53%; AC in 86% and 40%; CC in 3% and 7% of controls and patients respectively. The genotype frequency presented a statistically significant difference between AA and AC ($p < 0.001$). The A allele was more common in the group of patients (73% vs. 54%).

Conclusion: The rs13181 polymorphism in the ERCC2 gene (allele A) is more frequent in patients with senile cataract, the odds ratio indicates that they have 2.3 times the risk of developing it and it is suggested that allele C is a possible protector with an odds ratio of 0.43.

Key words: Senile cataract. Polymorphism. Blindness. Genotype. PCR. Allele.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Definición y epidemiología

La discapacidad visual puede ser definida como ceguera (visión menor o igual a 20/200 en el mejor ojo y menor de 20/400 para World Health Organization [WHO] o baja visión menor a 20/40 o menor a 20/60 de acuerdo a WHO). ^{1,2}

La catarata relacionada a la edad (ARC, por sus siglas en inglés) es el tipo más común de catarata, también es el líder de causas de discapacidad visual y ceguera en el mundo. Existen tres tipos de ARC: nuclear, cortical y subcapsular posterior. La cortical es más común en latitudes bajas ya que estas regiones tienen un alto nivel de UVR-B. La localización de la opacidad cortical es más pronunciada en el cuadrante nasal inferior del cristalino. ^{3,4}. Sin embargo el tipo más común de ARC es la nuclear. ⁵

Actualmente el único tratamiento definitivo es la cirugía y mientras que los resultados favorables son bastante predecibles, el limitado número de cirujanos en países subdesarrollados y el alto costo de la cirugía han hecho a la catarata un problema de salud pública de crecimiento global, con un estimado de 38 millones de personas y alrededor de 48% de todos los casos de ceguera, además existen 17 millones de personas con ceguera bilateral debido a catarata. Más del 50% de las personas mayores de 65 años de edad la padecen, incrementando su prevalencia hasta 75% en personas de 75 años. Se espera que para el año 2020 esta estadística se duplique debido al envejecimiento de la población. ^{5,6,7}

2.2 Etiología y factores de riesgo

Hasta ahora, aunque varias causas han sido sugeridas, no se conoce exactamente la patogénesis de la ARC. Los agentes propuestos incluyen edad avanzada, estrés oxidativo, radiación ultravioleta, defectos genéticos, diabetes, hipertensión, tabaquismo, alcoholismo, deficiencias nutricionales y obesidad, entre los más importantes⁸. De éstos, los primeros cuatro son considerados los agentes con mayor participación en su desarrollo; sin embargo, con una diferencia comparativamente significativa, el elemento primordial seguirá siendo la edad, pues pese a que suele referirse como un factor de riesgo independiente para ARC, muchos de los mecanismos fisiopatológicos que se le atribuyen dependen directa o indirectamente de la misma⁹. Además, se ha asociado el desarrollo de catarata en general con procesos diarreicos severos y deshidratación, índice de masa corporal¹⁰ y el uso de fármacos como corticosteroides inhalados¹¹, nifedipino, espironolactona, esteroides sistémicos y fenotiazinas mientras que la aspirina y otros AINES, así como la ciclopentiazida han mostrado un efecto protector¹². Cambios nutricionales han podido ser correlacionados principalmente por información obtenida de modelos animales, sugiriendo que dietas con mayor proporción de lípidos y proteínas y bajas en carbohidratos retrasan el desarrollo de catarata, así como dietas veganas, mientras que deficiencias significativas en aminoácidos como histidina, triptófano, fenilalanina, valina, leucina e isoleucina, así como en minerales como calcio, selenio, zinc y en vitaminas como riboflavina o vitamina E se correlacionan con mayor riesgo de formar opacidades¹³.

El perfil etiológico a su vez varía de acuerdo con el subtipo de ARC. De acuerdo con estudios epidemiológicos, las cataratas subcapsulares posteriores y corticales suelen corresponderse con estresores ambientales como rayos UV, diabetes o uso de drogas. Las cataratas nucleares suelen presentarse más en fumadores, mientras que el alcoholismo incrementa el riesgo de todos los subtipos. En conjunto todas reducen su frecuencia en una proporción directa con el nivel educativo, así como con la presencia de antioxidantes¹⁴.

2.3 Fisiopatología

Todas las cataratas tienen características similares como oxidación de los constituyentes del cristalino, pérdida de los antioxidantes, incremento en los niveles del calcio citosólico, activación de la proteólisis, desequilibrio iónico, hidratación, degradación y agregación de las proteínas cristalinas.¹⁵

2.3.1 Fisiología normal del cristalino

La transparencia del cristalino se mantiene por medio de dos factores principales. En primer lugar, la mayor parte de fibras celulares son metabólicamente inactivas es decir que pierden el núcleo y otros organelos siendo capaces de dispersar la luz. Estas células tienen muy alta concentración de proteínas estructurales (llamadas “cristalinas”), homogéneamente distribuidas dentro de las células. Esto provee alto índice refractivo al lente, necesario para focalizar la luz incidente sobre la retina. El segundo elemento involucrado en la óptica del cristalino se deriva de que éste no cuenta con un sistema vascular, por lo que obtiene los nutrientes y el oxígeno que requiere del humor acuoso que lo rodea. El cristalino humano consiste de 3 zonas metabólicamente diferentes: el epitelio, la corteza, y el núcleo.

El epitelio cubre la cara anterior del cristalino y es esencial para el crecimiento, diferenciación, y homeostasis¹⁶.

2.3.2 Agregación de proteínas

Desde hace tiempo ha sido identificada la relación entre cambios conformacionales y diferencias morfológicas en el plegamiento de las proteínas cristalinas que conducen a su menor solubilización, con la consecuente formación de cataratas. Es conocido que con la edad se acumulan numerosas modificaciones post-traduccionales que eventualmente resultan en la formación de agregados proteicos y dan lugar al desarrollo de ARC¹⁷.

Las células tienen mecanismos de protección frente a la acumulación de proteínas con plegamiento incorrecto, (inducidas por estresores como hipoglucemia, hipoxia, estrés oxidativo, inclusiones virales, entre otros) a través del reclutamiento de proteínas chaperonas cuya función consiste en modificar la estructura del péptido o la secuencia alterada para incrementar su solubilidad o, en caso de una modificación significativa e irreversible, señalarla con ubiquitina para que sea degradada por el proteosoma¹⁸. Cuando este sistema se satura, excediendo la concentración de agregados que pueden reciclarse, se activan diversas vías moleculares que favorecen el reclutamiento de calcio intracelular, que a su vez activa enzimas que pretenden detener el ciclo celular hasta reestablecer el balance de proteínas solubles o, de no conseguirlo, activar la apoptosis¹⁹.

Existen tres tipos principales de proteínas cristalinas, denominadas “a”, “b” y “g”, de las cuales la “a” es la más representativa y tiene función tanto refractiva y estructural como bioquímica, al servir como chaperona, mientras que la “b” presenta una función únicamente estructural (presente en el citoesqueleto, junto con la “a”) y la “g” mayormente refractiva en el núcleo del cristalino. Para la acción chaperona de la cristalina “a”, resulta esencial la separación y reunión entre subunidades A y B de diferentes proteínas tipo “a”. Existen mutaciones en estas subunidades que pueden provocar disminución en la tasa de intercambio, reduciendo su actividad chaperona, además de mutaciones que incrementan la actividad chaperona, formando agregados inestables entre sus sustratos y la cristalina. También pueden ocurrir cambios que favorecen la formación de homodímeros (dos subunidades A o dos B), generando oscilaciones pequeñas pero acumulativas en la transparencia estructural. Algunas alteraciones postraduccionales (metilación, alquilación, sulfuración, etc.) de otras proteínas (como las cristalinas “b” y “g”), pueden generar formas insolubles y provocar que subunidades de las cristalinas tipo “a” se unan a ellos en lugar de a su subunidad correspondiente, deteriorando con ello la función de chaperona²⁰.

En general, la formación de grupos sulfhidrilo, glicación o la desaminación de residuos como arginina resulta en la agregación de proteínas del citoesqueleto y las cristalinas. La disminución progresiva del metabolismo de carbohidratos también favorece la aparición de productos terminales de glicación avanzada que fomentan el estrés oxidativo y la glicación de cristalinas.

Además, se ha observado que una mayor actividad proteasa de la calpaína disminuye la concentración de proteínas del citoesqueleto y con la edad incrementan los esfingolípidos y se reduce el colesterol y los fosfolípidos de las membranas celulares epiteliales, alterando tanto la permeabilidad y el potencial eléctrico (generando cambios en la concentración de moléculas intracelulares), como la organización estructural y la unión intercelular, favoreciendo la opacidad²¹.

2.3.3 Mecanismos relacionados con el transporte celular

A largo plazo la integridad del cristalino es provista por metabolitos, sintetizados en el epitelio del cristalino metabólicamente activo o dentro del cristalino a través de capa epitelial, obteniéndolos del humor acuoso²². La concentración de aminoácidos es mayor en el cristalino que en el humor acuoso. La acumulación de metabolitos en el cristalino en contra del gradiente de concentración significa que la penetración de pequeñas moléculas dentro del cristalino es dirigida por bombas activas, situadas en la capa epitelial del mismo. Se requieren diferentes tipos de bombas para cada uno de los componentes; los mecanismos moleculares de algunas bombas selectivas han sido reportados. Sin embargo, los mecanismos del movimiento de los metabolitos dentro del cristalino aún se encuentran en debate. La alteración en el sistema de transporte del cristalino puede generar un efecto deletéreo para el núcleo del mismo debido al déficit de filtros UV y antioxidantes y a la acumulación de productos oxidados²³.

Añadido a los cambios descritos, se ha observado que pueden existir alteraciones en las uniones gap, caveolinas y conexinas²⁴. inducidas por acumulación de especies reactivas de oxígeno que activan las proteínas cinasas (PKC) y fosforilan varias subunidades de estos péptidos alterando su estructura y función, conduciendo a una alteración estructural e inestabilidad del cristalino²⁵.

2.3.4 Estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas pequeñas y difusibles que son altamente reactivas debido a la falta de apareamiento de su electrón de valencia y aunque las formas más conocidas son derivadas del oxígeno (peróxido de hidrógeno, superóxido, oxígeno singlete, radical hidroxilo), también existen radicales de nitrógeno. Estas especies reactivas pueden provenir de fuentes exógenas (radiación UV, toxinas, microorganismos) o endógenas (enzimas como mieloperoxidasa, NADPH oxidasa, xantina oxidasa, etc.)²⁶. En circunstancias normales, se producen cantidades bajas de estas sustancias sin ser deletéreas, e incluso a veces siendo benéficas, teniendo funciones microbicidas, mitogénicas y preparando la respuesta frente a la anoxia. No obstante, cuando se pierde el balance entre moléculas antioxidantes y radicales, éstos reaccionan con las biomoléculas funcionales (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), dañando la estructura de la membrana, el plegamiento peptídico y la secuencia genómica²⁷.

En pacientes con ARC se ha detectado disminución en la concentración de moléculas antioxidantes como glutatión y tioredoxina o NADH y FADH₂, así como concentraciones elevadas de radicales como el H₂O₂. En el humor acuoso normal existen entre 25–30 µM de éste, mientras que se triplica su valor en pacientes con

ARC, observándose también que cuando las concentraciones de Glutación son menores de 1 mM, la producción de especies reactivas se acelera considerablemente.²⁸

Las principales enzimas antioxidantes en el cristalino incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y glutación peroxidasa. SOD provee la primera línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS). Existen tres isoformas identificadas de SOD (SOD1, SOD2, SOD3 citosólicas), SOD1 es la mayor isoforma en el cristalino y provee cerca del 90% del total de actividad de SOD en el cristalino. Estudios que han demostrado la carencia de estas enzimas muestran signos de envejecimiento temprano tales como: pérdida de la audición, degeneración neurológica, degeneración macular relacionada a la edad, vida corta y desarrollo de catarata en edades tempranas. La sobreexpresión de SOD1 muestra la prevención el daño oxidativo por ROS en cristalino y por lo tanto el control en la formación de catarata. Sin embargo, el mecanismo preciso de disminución de expresión de SOD1 en catarata senil no ha sido bien establecido aún. Como hemos mencionado, desarrollo de cataratas está relacionado con la acumulación de metabolitos de la glucosa dentro del cristalino y proteínas de glicación. La autooxidación de azúcares es considerada como una fuente de ROS. En general, el daño oxidativo del ADN ha sido implicado como factor causal de una gran variedad de enfermedades degenerativas, en cáncer y en envejecimiento²⁹.

La lipoperoxidación debido al estrés oxidativo ha sido correlacionada con el nivel de productos de degradación de la misma acumulados en el cristalino. Los productos tóxicos de peroxidación inducen fragmentación de las proteínas solubles del cristalino y daño a estructuras de la membrana que se correlacionan con un incremento en la opacidad del cristalino y cambios en sus propiedades refractivas³⁰.

Los productos de la oxidación excesiva pueden generar daño sobre las células epiteliales causando apoptosis y muerte de las mismas. El daño en estas células puede ser la etiología esencial para promover la formación de opacidad ya que el metabolismo y el mantenimiento del cristalino depende de las células epiteliales³¹.

2.3.5 Alteraciones en la reparación del ADN

Los desórdenes genéticos que afectan la eficacia de los mecanismos responsables de reparar el ADN potencialmente desarrollan un entorno de predisposición a daños irreversibles provocadas por lesiones endógenas y exógenas. De este modo, algunas mutaciones podrán ser responsables en diferente proporción del desarrollo de ARC³².

Los procesos de reparación del ADN reconocen, remueven y reparan errores en la molécula producidos durante su replicación, constituyendo los principales mecanismos celulares que garantizan la estabilidad genética y consecuentemente, la propia supervivencia de la célula. Hasta ahora se han identificado más de 100 genes encargados de reparar el ADN y sus polimorfismos están relacionados con algunas enfermedades³³.

Los principales mecanismos de reparación de la molécula de ADN en los seres vivos y su activación frente a agentes genotóxicos, que pueden tornarse mutagénicos si no son reparados correctamente son:

Mecanismo por reversión de la lesión: reparación directa.

Es realizada por una única enzima capaz de reparar la lesión, sin necesidad de substituir la base dañada. Así, la estructura original de la molécula del ADN revierte la lesión. Existen tres mecanismos en la reparación directa: fotorreactivación, alquiltransferencia, y desmetilación oxidativa³³.

- a) Fotorreactivación: la radiación UV (longitud de onda entre 250 y 320 nm), pueden ocasionar alteraciones químicas en las bases del ADN. Los fotoproductos de estas reacciones originan los dímeros de pirimidinas ciclobutano y pirimidina, que causan inhibición de la replicación y de la transcripción, aumento en la tasa de mutaciones, detención del ciclo celular y muerte celular. Los efectos mutagénicos generados por la radiación UV son invertidos por un proceso llamado fotorreactivación, catalizado por una fotoliasa que posee dos cromóforos que captan un fotón, cuya energía es utilizada para revertir el dímero, es decir, quiebra el enlace covalente entre las pirimidinas, reparando el daño en el ADN. Las fotoliasas han sido encontradas en bacterias, hongos, plantas y vertebrados, excepto en mamíferos placentarios.³³

- b) Alquitransferencia: este mecanismo consta de la remoción de aductos alquilo en las bases del ADN. Generalmente estos grupos son incorporados al ADN en forma de agentes alquilantes, como el metil-metano-sulfonato (MMS) o por agentes enzimáticos (metilasas). Una de las alteraciones más conocidas en el ADN es la metilación de restos de guanina para formar O-metilguanina, para lo cual la célula utiliza enzimas “suicidas” llamadas alquitransferasas, que desplazan el grupo metilo desde la guanina al centro activo de la cisteína, llevando a la inactivación irreversible de la proteína O-metilguanina-ADN metiltransferasa³⁴.
- c) Desmetilación oxidativa: Remueve daños por metilaciones en el ADN que pueden ser citotóxicas y con frecuencia presentan acción mutagénica, causada por compuestos nocivos que se producen de forma endógena como estrés oxidativo, inflamación, peroxidación de lípidos, infecciones y otros procesos metabólicos naturales como la alteración de la microbiota intestinal. Todos los organismos tienen múltiples estrategias de reparación para contrarrestar daños al ADN; tal es el caso de las alquilaciones. La proteína AlkB se encarga de desmetilar oxidativamente las bases lesionadas, revirtiéndolas hacia adenina y citosina, respectivamente, liberando así el grupo metilo en formaldehído. Han sido identificados homólogos de AlkB como ABH1, ABH2 Y ABH3. ³³

Mecanismo por sistemas de reparación indirecta:

Son aquellos que intervienen durante la replicación (fase S del ciclo celular), transcripción o sobre hebras de ADN fragmentadas. La ADN polimerasa y algunos de los componentes moleculares del mecanismo de replicación llevan a cabo la supervisión de la copia recién sintetizada. Puesto que el ADN se replica de una forma semi-conservativa, si los nucleótidos en una hebra presentan un daño, pueden ser eliminados utilizando como molde a la cadena complementaria para la síntesis de la reparación. Existen tres mecanismos en la reparación indirecta: reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por escisión de bases (BER) y reparación por rotura de la doble cadena (DSB)³⁵.

La vía de BER opera sobre lesiones pequeñas tal como: oxidación o reducción de bases, fragmentación o agentes producidos por metilación. Por otro lado, la vía NER repara lesiones voluminosas, tal como dímeros de pirimidina y enlaces cruzados. Las vías BER y NER implica un proceso altamente coordinado catalizado por acciones secuenciales de enzimas de reparación del ADN y juegan un papel crítico en mantener la estabilidad e integridad del genoma. Los polimorfismos de los genes que reparan el ADN han sido asociados previamente con cáncer, degeneración macular y ARC. La vía NER incluye dos sub-vías, las cuales inician de diferente manera, pero después de reconocer el daño, proceden a lo largo de la misma ruta molecular. Las sub-vías son designadas como transcripción acoplada NER (TC-NER) y genoma global NER (GG-NER). TC-NER es responsable de eliminar lesiones en la cadena de transcripción de genes activos³⁶.

Este proceso de reparación cuida de lesiones bloqueando la maquinaria de transcripción. GG-NER reconoce y remueve lesiones a lo largo de todo el genoma, y es considerada relativamente lenta y algo más ineficiente. Ambas vías se pueden dividir en cuatro fases: a) reconocimiento del daño al ADN, b) reclutamiento del complejo de pre-incisión y reclutamiento del ADN, c) creación de incisiones duales que rodeen el sitio de lesión y posteriormente la escisión del fragmento dañado y d) reparación del ADN por medio de síntesis y unión. ³⁶ El gen ERCC2 provee instrucciones para fabricar una proteína llamada xeroderma pigmentoso grupo de complementación D (XPD) es la enzima clave para la vía NER, esta proteína es una parte esencial de un grupo de proteínas conocidos como factor de transcripción II humano (TFIIH) que es un importante complejo proteico que desempeña funciones en la transcripción de varios genes y vías de reparación de escisión de nucleótidos de ADN (NER). El TFIIH consta de 10 subunidades, dos de las cuales tienen actividad helicasa y ATPasa e intervienen en la transcripción. ³⁷

El grupo B y D del xeroderma pigmentoso (ERCC3/XPB y ERCC2/XDP) son proteínas pertenecientes a la vía NER que funcionan como helicasas de ADN dependientes de ATP, responsables de abrir las cadenas de ADN alrededor del sitio de lesión permitiendo eliminar ciertos enlaces cruzados de ADN, foto-lesiones UV entre otros. Los polimorfismos en los genes reparadores del ADN pueden ser responsables de modificar la función y/o competencia del reparador de ADN o pueden ser factores de susceptibilidad genética. ³⁸

Las mutaciones que abolen la función de la proteína XPD se manifiestan clínicamente en combinaciones de tres síndromes, síndrome de Cockayne, xeroderma pigmentoso, y tricotiodistrofia dependiendo de la localización de la mutación.³⁹

Las modificaciones covalentes de histonas, incluyen acetilación, metilación, y fosforilación, alteran la configuración de la cromatina por interacción con los factores de transcripción y la maquinaria basal transcripcional. Entre las modificaciones, la acetilación de histonas ha sido estudiada extensamente, y esto ocurre principalmente en la región promotora de genes transcritos. Es un proceso dinámico controlado por histona acetiltransferasa y la histona deacetilasa.⁴⁰ Los inhibidores de la histona deacetilasa bloquean los efectos de ésta, puede también mejorar la acetilación de histonas, alterando la transcripción. La acetilación de H3 y H4 disminuye significativamente la expresión de SOD1. La regulación de acetilación de histona sobre la expresión de SOD1 juega un rol esencial en la patogénesis de catarata senil.⁴¹

El cribado para encontrar una posible relación entre los polimorfismos en los genes de reparación del ADN o en otras vías de estrés celular oxidativo o del retículo endoplásmico y la generación de catarata pueden contribuir a ampliar la comprensión de la patogénesis de la misma y posteriormente utilizarse en la prevención de la enfermedad, sabiendo que la combinación de factores genéticos y medioambientales resultan en desarrollo de ARC.

3 PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

3.1 Planteamiento del problema

La catarata hoy en día es considerada un problema de salud pública, debido al incremento exponencial de su prevalencia. Además de ser la cirugía hasta hoy en día la única solución definitiva, y esto nos permite darnos cuenta de las limitaciones que hay; tales como, el costo de la misma y el número limitado de cirujanos que pueden realizarla sobre todo en países subdesarrollados como el nuestro. Por eso considero importante encontrar vías alternas que formen parte del tratamiento.

3.2 Justificación

En la actualidad no se tiene clara la patogénesis en catarata senil; sin embargo, se plantea la posibilidad de que los polimorfismos en genes de reparación del daño al ADN causado por mecanismo diversos tanto intrínsecos del individuo como extrínsecos del medio ambiente, pueden permitir que el daño principalmente en las células epiteliales del cristalino se acumule y termine propiciando opacidad del mismo. El identificar estos polimorfismos sería de gran relevancia para la oftalmología al poder intervenir evitando o retrasando su aparición.

3.3 Pregunta de Investigación

¿El polimorfismo en el gen ERCC2 se encuentra involucrado en la patogénesis de la catarata senil?

3.4 Hipótesis

El polimorfismo en el gen ERCC2 se ve involucrado en la patogénesis de la catarata senil.

3.5 Objetivos

3.5.1 Objetivo general

Identificar la presencia del polimorfismo en el gen ERCC2 en pacientes con diagnóstico de catarata senil en Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, IAP.

3.5.2 Objetivos específicos

- Comparar la presencia de polimorfismo en gen ERCC2 en pacientes con y sin catarata senil.
- Comparar la frecuencia genotípica de pacientes con diagnóstico de catarata senil y sujetos control
- Comparar la frecuencia alélica de pacientes con diagnóstico de catarata senil y sujetos control

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio observacional, comparativo, transversal y prospectivo. Se reclutó a dos grupos de estudio: los pacientes con catarata senil y un grupo control sano.

4.1 Grupo de estudio

4.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes con catarata senil. De acuerdo al Sistema de Clasificación de Opacidades del Cristalino (Lens Opacities Classification System III, LOCS III)
- Edad mayor a 55 años
- Capacidad visual menor a 20/40
- Sin otra patología causante de baja visual

4.1.2 Criterios de exclusión:

- Catarata asociada a enfermedad sistémica
- Pacientes con diagnóstico de uveítis, glaucoma, degeneración macular relacionada a la edad.
- Cirugía ocular previa
- Catarata traumática

4.2 Grupo control

4.2.1 Criterios de inclusión

- Edad mayor a 55 años
- Cristalino transparente
- Capacidad visual mayor a 20/25 ambos ojos

4.2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes con diagnóstico de uveítis, glaucoma, degeneración macular relacionada a la edad.
- Cirugía ocular previa

4.2.3 Criterios de eliminación

- Expediente clínico incompleto
- Decisión del paciente de retirarse del estudio

4.3 Aspectos éticos y técnicos

El protocolo fue aprobado por el comité de ética e investigación y se siguieron los lineamientos de la Declaración de Helsinki.

Con la firma del consentimiento bajo información de todos los pacientes incluidos en el estudio se llevó a cabo la obtención de una muestra de sangre, utilizando EDTA como anticoagulante. Se realizará la extracción de ADN utilizando el kit QIAamp mini kit® (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor. A 200 microlitros de la muestra se le adicionará 250 microlitros de la solución de la lisis CLS, las muestras serán incubadas a 56 °C por 60 minutos, en presencia de 30 microlitros de proteinasa K (1mg/ml) agitándose en vórtex cada 10 minutos. Posteriormente se adicionarán 100 microlitros de la solución de precipitación para incubar en refrigeración por 5 minutos. Las muestras serán centrifugadas nuevamente y se decantarán en un tubo de Eppendorf para hacer los lavados con 300 microlitros de isopropanolol, se homogeniza invirtiéndolos 50 veces de manera suave, con una tercera centrifugación por 5 minutos, se decanta el sobrenadante y se precipita con 300 microlitros de etanol al 70%.

Las muestras se dejarán concentrar a 35 °C por 12 horas donde finalmente se agregarán 100 microlitros de solución hidratante; el material genético será almacenado a -20 °C hasta su estudio. En este momento se realiza la amplificación del gen ERCC2 por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos diseñados para la región del SNP rs 13181 y rs1799793.

Posteriormente, se realizará secuenciación directa con la técnica de secuenciación por terminadores fluorescentes (BigDye).

4.4 Análisis estadístico

Para valorar la comparación de los grupos por edad se realizó una prueba de t de Student. Se realizó análisis comparativo usando la prueba de Chi cuadrada (intervalo de confianza del 95%) y calculando la razón de momios para frecuencia genotípica y frecuencia alélica (GraphPad Prism V5.0). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Se realizó el análisis de 52 muestras de pacientes con catarata senil y 31 sujetos control con cristalino transparente, Como se observa en la figura 1, el promedio de edad es de 73 ± 13 años y 68 ± 16 años respectivamente; sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. El porcentaje del género femenino fue de 45% para el grupo de estudio y en el grupo control de 57%

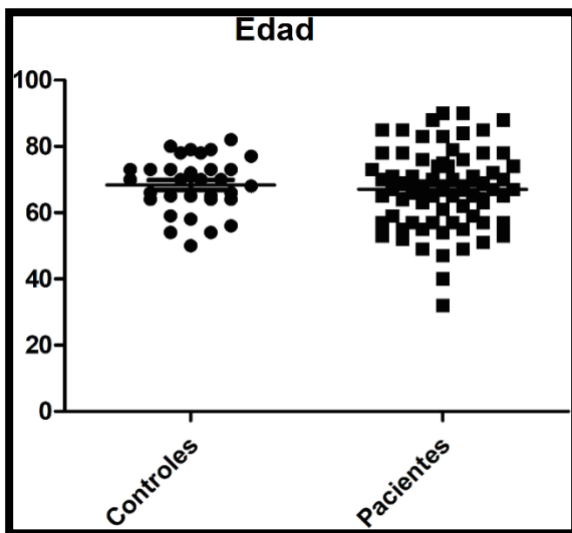


Figura 1. Mediante la prueba “T no pareada” para la comparación de grupos por edad, en la cual se obtuvo $p= 0.5672$, siendo: no estadísticamente significativo por lo que ambos grupos son comparables.

Se obtuvo el amplificado por PCR del fragmento del gen ERCC2 en donde se localiza la región de interés. En la figura 2 se observa el gel de agarosa al 1.5% mostrando las bandas de amplificación después de realizar la electroforesis.

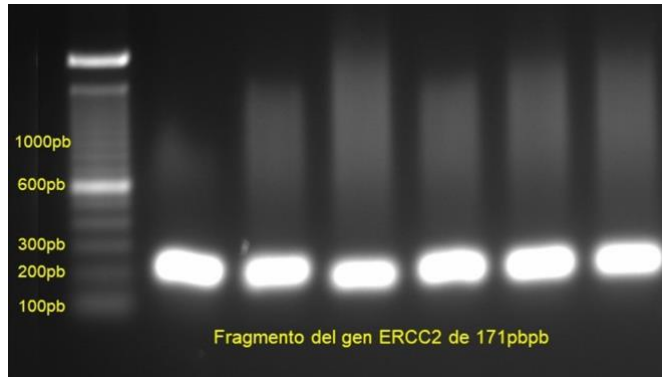


Figura 2. Gel de agarosa al 1.5% en donde se observan los amplificados del producto de PCR. Revelado con GelRed y revelado con luz UV.

Después de haber realizado la secuenciación nucleotídica se obtuvieron los genotipos del polimorfismo rs13181.

5.1 Frecuencia genotípica

El análisis de Chi cuadrada comparando los grupos de controles y pacientes muestra una diferencia significativa con un valor de $p < 0.0001$. Al analizar los grupos controles y pacientes por genotipo utilizando la prueba exacta de Fisher, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3, encontrando que los pacientes con ARC presentan con mayor frecuencia el genotipo AA respecto a los controles (53% vs 11%), El genotipo AC fue más prevalente en los controles (85% vs 40%), mientras que la frecuencia del genotipo CC reveló poca diferencia entre ambos grupos con una ligera mayoría en los pacientes (3% vs 7%). Al comparar este genotipo con el AC y el CC, como se representa en la tabla 1, en los genotipos que tienen presencia del alelo C la razón de momios es menor (AC 0.096 y CC 0.484), por lo que se justifica el análisis de la frecuencia alélica (ver tabla 2 y explicación posterior).

Tabla 1. Frecuencia genotípica

ERCC2 rs13181	Controles	Pacientes	p	OR
AA	3 (11%)	16 (53%)		
AC	24 (86%)	12 (40%)	<0.001	0.096
CC	1 (3%)	2 (7%)	0.3878	0.484

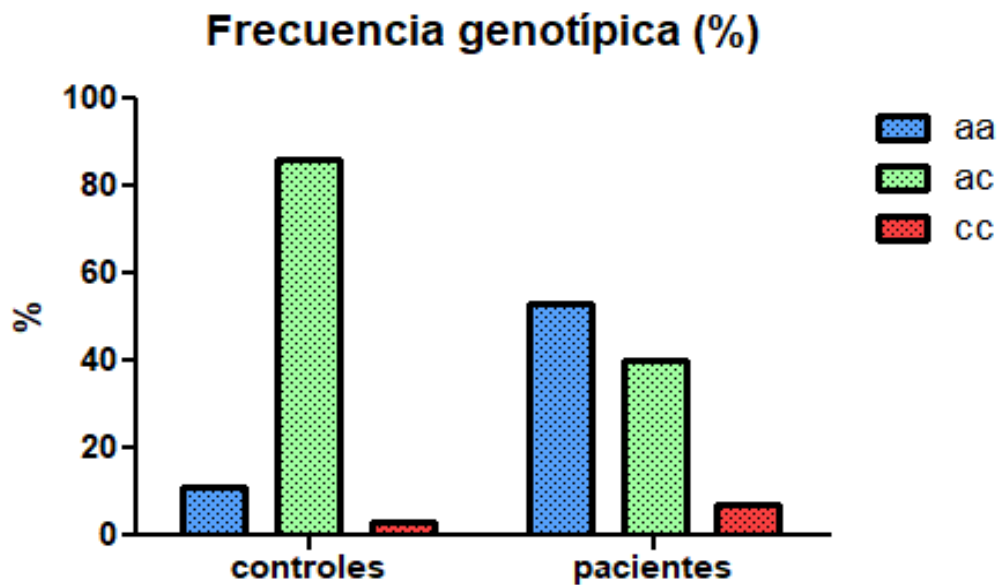


Figura 3. Distribución de la frecuencia genotípica de pacientes y controles

5.2 Frecuencia alélica

Al analizar los grupos controles y pacientes por frecuencia alélica, utilizando la prueba exacta de Fisher, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 2, donde se identifica que el alelo A se encuentra en mayor frecuencia en el grupo de pacientes con ARC que en los controles (73% contra 54%), algo que puede a su vez observarse en la gráfica de distribución (figura 4), donde también se comparan las frecuencias del alelo C para ambos grupos, encontrándose una mayor presencia del mismo en quienes no padecen ARC (46% vs 27%).

En congruencia con lo descrito previamente, en la tabla 2 a su vez se puede apreciar el valor de OR para el alelo C (0.43), con lo que se obtiene que el alelo A presenta una frecuencia 2.3 veces mayor que el C.

Tabla 2. Frecuencia alélica

ERCC2 rs13181	Controles	Pacientes	p	OR
A	30 (54%)	44 (73%)	0.008	0.43
C	26 (46%)	16 (27%)		

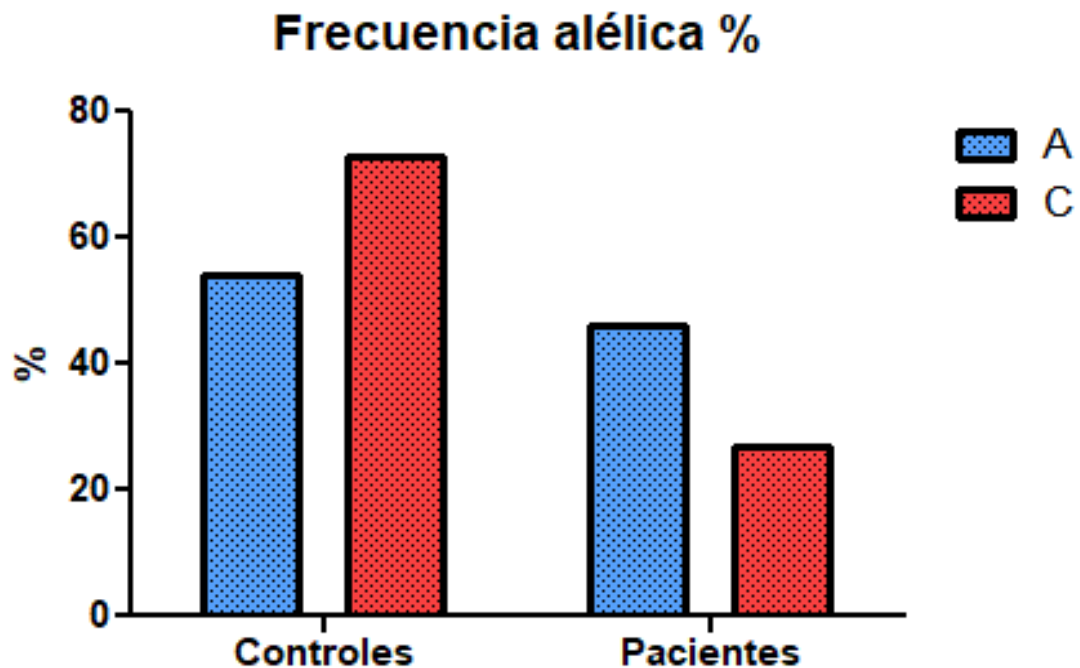


Figura 4. Distribución de la frecuencia alélica de pacientes y controles

6 DISCUSIÓN

La catarata hoy en día es considerada un problema de salud pública, debido al incremento exponencial de su prevalencia. La única terapia curativa para la ARC es la cirugía, sin embargo ésta presenta ciertas limitaciones, tales como el costo de la misma y el número limitado de cirujanos que pueden realizarla, sobre todo en países subdesarrollados como el nuestro, lo que nos ha llevado a pensar en otras alternativas, como el estudio de genes que estén involucrados en la patogénesis de la misma y que pudieran utilizarse como blancos farmacológicos para promover la reparación del ADN y mantener la estabilidad del genoma.

La ARC es una de las principales causas de ceguera tratable en el mundo, considerándose una patología altamente invalidante que afecta la vida diaria. Hasta hoy en día existen pocos estudios que relacionen la aparición de cataratas con polimorfismos genéticos específicos que aumentan la predisposición a padecerla. Tomando en consideración que los factores genéticos pueden ser responsables de hasta el 50% de la severidad de la ARC, resulta importante estudiar genes blanco que puedan estar implicados⁴². La finalidad de este estudio fue valorar la asociación del polimorfismo rs13181 del gen ERCC2 con ARC.

Las células cuentan con mecanismos complejos que vigilan la integridad del ADN, activando mecanismos de reparación cuando hay deficiencias o errores durante la replicación. Una consecuencia potencial de los daños son las alteraciones permanentes en la estructura del ADN que pueden generar mutaciones, transformación carcinogénica y muerte celular.⁴³

De esta manera cerca de 10^5 lesiones espontáneas por día son inducidas en nuestros genes, en donde los mecanismos de reparación detectan daños y perturbaciones durante el crecimiento y división celular. ⁴⁴

El estrés oxidativo ha sido ampliamente reconocido como un importante mediador de apoptosis en células epiteliales del cristalino y también se encuentra involucrado en la patogénesis de la catarata ⁴⁵ Así mismo ha sido identificado como una de las mayores causas de enfermedades relacionadas con la edad, incluyendo padecimientos cardiovasculares, artritis, disfunción cerebral, enfisema y catarata. Se origina del desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la eliminación de los mismos por múltiples defensas celulares antioxidantes. La cantidad excesiva de ROS son potencialmente deletéreas para las células porque interaccionan con macromoléculas celulares como ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos; pueden causar degradación, enlaces cruzados y agregación de las proteínas del cristalino. El exceso de ROS, junto a glicación de proteínas están fuertemente asociadas con el daño al cristalino y la alteración de la dispersión de luz ⁴⁶.

En nuestro estudio las edades de los sujetos de investigación considerando ambos grupos oscilan entre 55 y 86 años, con un promedio de 70, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura internacional ya que esta entidad se presenta mayormente en pacientes con edad superior a los 65 años de edad.

La ARC se presentó con menor frecuencia en el género femenino (45%), lo que difiere del artículo escrito por Barroso, donde se analizaron 220 pacientes con ARC de los cuales el 65.4% eran mujeres y otro estudio realizado en 2015 por Martínez Lamas et al, donde se estudiaron 155 pacientes y de estos 51% correspondían al sexo femenino ^{47,48}.

En el análisis de frecuencia genotípica podemos observar que los pacientes presentan una frecuencia del genotipo AA mayor que los controles (55% contra 11%) y, a pesar que la frecuencia del genotipo CC es similar entre ambos grupos, el genotipo AC es mayor en el grupo control, esto sugiere que el genotipo AC disminuye el riesgo de desarrollar ARC, tal vez se deba a un efecto protector del alelo C lo cual se comprueba en el análisis de frecuencia alélica.

El alelo A se encuentra en mayor frecuencia en el grupo de pacientes que en controles (73% contra 54%), esto podría indicar que el alelo A representa un factor de riesgo para el desarrollo de ARC. El valor de OR (0.43) nos sugiere que el alelo C es un factor protector para desarrollar ARC, mientras que el alelo A es un factor de riesgo, teniendo un valor 2.3 veces superior que los portadores del alelo C.

El cribado para encontrar una posible relación entre los polimorfismos en los genes de reparación del ADN y catarata pueden contribuir a entender la patogénesis del desarrollo de ésta y utilizarse en la prevención de la enfermedad.

Se requiere de más estudios en donde se analice una mayor muestra de pacientes y se precise, sobre los mecanismos de reparación del ADN en los polimorfismos presentes en ARC. Otros genes que podrían representar en un futuro un blanco terapéutico y el objeto de estudio de investigaciones semejantes a la que se presenta, son los relacionados con la vía de estrés del retículo endoplásmico, que han sido estudiados como un elemento muy importante en la fisiopatología de la degeneración celular que sufre el epitelio como consecuencia de la agregación anómala de proteínas, como sucede en muchas enfermedades de causa degenerativa en cuyos factores de riesgo la edad está fuertemente asociada ^{49,50}, así como otros polimorfismos del gen XPD que como mencionamos resulta crucial en el proceso de reparación, siendo esto importante en la rapidez y severidad con que se pueden reproducir eventos degenerativos celulares como los que se presentan en la catarata^{51, 52}.

La generación de daño crónico e irreversible del cristalino se puede resumir entonces estableciendo la predisposición genética y los factores adquiridos. Como parte del envejecimiento celular y la exposición a agentes ambientales (UV, toxinas, infecciones, productos químicos), se acumulan radicales libres y se generan proteínas mal plegadas como consecuencia de una menor reserva de sistemas de balance metabólico y oxidativo, lo cual en un entorno de susceptibilidad genética que vuelve ineficientes los mecanismos de reparación del ADN, favorece que dichos agentes ocasionen lesiones más significativas y con mayor facilidad en las biomoléculas estructurales y en el genoma de lo que causarían en un entorno no predispuesto.

A su vez, los daños al material genético afectan la síntesis y la función de proteínas protectoras, como enzimas antioxidantes, bombas de transporte que mantienen los agentes oxidativos en concentraciones bajas y moléculas de reparación del ADN, lo cual retroalimenta y perpetúa el daño al mismo.

Como parte de este ciclo, la oxidación crónica involucra la formación de enlaces disulfuro entre moléculas peptídicas y no peptídicas, lo que altera su solubilidad (favoreciendo mayor agregación) y entonces activa vías de estrés de retículo endoplásmico que desencadenan apoptosis celular (misma que puede activarse también por otras vías oxidativas directamente).⁵³ El entrecruzamiento anormal de péptidos sulfurados debido a la oxidación fomenta la activación o inactivación anormal de enzimas, distorsionando las vías moleculares que mantienen las bombas de transporte, reparación del ADN y plegamiento adecuado de proteínas. Resulta evidente con este análisis que casi cualquier punto de la ruta patogénica afecta a todos los demás, lo que explica que la etiología sea multifactorial y el riesgo atribuible sea mejor representado como un espectro diverso y amplio.

Ampliar el marco de investigación genómica en una patología con consecuencias que repercuten en la calidad de vida y capacidad funcional de los pacientes es hoy una prioridad y enfatiza la necesidad de buscar nuevos enfoques en la prevención, detección oportuna y tratamiento dirigido, particularmente debido a la poca evidencia reportada para esta patología en concreto, si bien existen reportes de genes semejantes que se han detectado en patologías con vías moleculares patogénicas relacionadas.

7 CONCLUSIÓN

La única solución a la catarata senil es la cirugía; sin embargo, esta presenta ciertas limitaciones que nos ha llevado a pensar en otras alternativas, como el estudio de genes. En este estudio se logró demostrar que, en la población de riesgo por la edad, el polimorfismo rs13181 en el gen ERCC2 es más frecuente en sujetos que han desarrollado ARC que en individuos que no la padecen (OR 2.3). Además, el alelo A está asociado con un mayor riesgo, mientras que el alelo C presenta un comportamiento opuesto, sugiriendo un papel protector (OR 0.43). La evidencia sobre la patogenia de la ARC enfatiza la importancia de comprender la magnitud con la que las mutaciones en los genes de reparación del ADN y en otras vías pueden promover la génesis de la ARC, de modo que resulta prioritario encontrar los mejores blancos genéticos, los que podrían servir como un potencial marcador de predisposición que puede ser útil como tamizaje o proporcionar una estrategia terapéutica para retardar la progresión de la ARC.

Así, considero que este estudio refuerza el cuerpo de evidencia, mejorando no solo la comprensión de la patogenia de esta entidad sino amplificando el horizonte de posibilidades de impacto en los pacientes que la padecen.

8 ANEXOS

CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

En esta institución se desarrollan investigaciones que forman parte de nuestro quehacer científico. Las características de su padecimiento son consideradas de interés para participar en este estudio de acuerdo a las especificaciones siguientes:

Datos generales

<i>Datos del paciente</i>	Nombre: Fecha de nacimiento:
<i>Expediente clínico No.</i>	
<i>Médico informante (investigador principal):</i>	Claudio Emmanuel Hernández Guzmán Firma:
<i>Diagnóstico</i>	Catarata Senil

Datos de la investigación

<i>Nombre del protocolo</i>	Polimorfismo rs13181 y rs1799793 del gen ERCC2 en pacientes con catarata senil.
<i>Investigadores</i>	Dr. Claudio Emmanuel Hernández Guzmán, Dra. Claudia Palacio Pastrana, Dr. Héctor Javier Pérez Cano.
<i>Justificación y objetivos</i>	La catarata es un problema de salud pública. Se requiere encontrar información que nos de la oportunidad de crear nuevas estrategias de tratamiento.
<i>Periodo de estudio o duración</i>	1 a 2 años
<i>Cantidad de sujetos que participarán</i>	100
<i>Descripción de los métodos a emplear y su propósito</i>	Se obtendrá muestra de sangre venosa. Extracción de ADN utilizando el kit QIAamp mini kit siguiendo las indicaciones del proveedor. Amplificación de los genes ERCC2 utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Secuenciación directa. Análisis de datos.
<i>Beneficios esperados:</i>	
<i>Alternativas:</i>	
<i>Riesgos o molestias:</i>	Sangrado excesivo, hematoma, infección, dolor.
<i>Grupo de control</i>	En caso de que la presente investigación incluya un grupo de control, la selección de los participantes se sujetará a un proceso estrictamente aleatorio e imparcial,

	privilegiando la prevención de cualquier riesgo o daño para sus integrantes.
<i>Gastos</i>	Los gastos propios de la investigación serán cubiertos por la institución.

<i>Confidencialidad</i>	Su identidad y la información que proporcione como parte de esta investigación serán tratadas bajo criterios de confidencialidad. En caso de que los resultados exijan su identificación, previamente se le solicitará la autorización correspondiente.
<i>Dudas, aclaraciones y actualización</i>	<p>El participante tendrá derecho a recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y su tratamiento.</p> <p>Asimismo, durante el presente estudio le proporcionaremos información actualizada sobre su estado de salud para que esté en posibilidad de decidir si continúa participando.</p> <p>Es importante que sepa que retirar su participación no afectará su atención en el hospital.</p>

Consentimiento

Por este medio manifiesto mi satisfacción con la información recibida y, consciente de las especificaciones y en qué consiste la investigación descrita en este documento, sus beneficios, riesgos y consecuencias, **otorgo mi consentimiento para incorporarme a ella, asumiendo el compromiso de (1) asistir puntualmente a las citas que se me indiquen y (2) proporcionar verazmente la información de mi evolución en la forma y periodicidad que se requiera.**

Asimismo, entiendo que puedo retirarme de esta investigación voluntariamente en cualquier momento sin mayor requisito que la manifestación al investigador principal o a la Dirección Médica de este hospital.

Ciudad de México a ___ de _____ de ____.

Firma del paciente

Testigos

Nombre y firma

Domicilio:

Relación con el paciente:

Nombre y firma

Domicilio:

Relación con el paciente:

9 REFERENCIAS

1. Congdon N., Friedman D., Lietman T. Important Causes of Visual Impairment in the World Today. *JAMA*, October 15, 2003-Vol 290, No 15, 2057-2060.
2. Javitt J. C., Wang F., Blindness due to cataract: Epidemiology and Prevention. *Atuiu Rev. Public Heultlr.* 1996. 17.159-177.
3. Galichanin K., Löfgren S., Söderberg P. Cataract after repeated daily in vivo exposure to ultraviolet radiation. *Health Phys.* 2014 Dec;107(6):523-9.
4. Sliney D. H., Intraocular and Crystalline Lens Protection From Ultraviolet Damage. *Eye & Contact Lens.* 2001.37 (4) 250-258.
5. Marsili S., Salganik R., Albright C., Freel C., Johnsen S., Peiffer R., Costello M. Cataract formation in a strain of rats selected for high oxidative stress. *Exp Eye Res.* 2004 Nov;79(5):595-612.
6. Yang M, Zhang J, Su S, Qin B, Kang L, Zhu R, Guan H. Allelic interaction effects of DNA damage and repair genes on the predisposition to age-related cataract. *PLoS One.* 2018 Apr 24;13(4):e0184478.
7. Khosa T., Aslam S., Mustafa S., Akbar A., Shaikh R., Iqbal F. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in XRCC1 (194) and XPD (751) with Age-related cataract. *Int Ophthalmol.* 2018 Jun;38(3):1135-1146.
8. Robman L., Taylor H. External factors in the development of cataract. *Eye* (2005) 19, 1074-1082.
9. Taylor HR. Epidemiology of age-related cataract. *EYE.* 1999;13 (Pt 3b)(3):445–8.
10. Hiller R, Podgor MJ, Sperduto RD, Nowroozi L, Wilson PWF, D'Agostino RB, et al. A longitudinal study of body mass index and lens opacities. *Ophthalmology.* 1998;105(7):1244–50.
11. Cumming RG, Mitchell P, Leeder SR. Use of inhaled corticosteroids and the risk of cataracts. *N Engl J Med.* 1997;337(1):8–14.

12. Harding JJ, van Heyningen R. Epidemiology and risk factors for cataract. *EYE*. 1987;1 (Pt 5)(5):537–41.
13. Bunce GE. Nutrition and cataract. *Nutr Rev*. 1979;37(11):337–43.
14. West SK, Valmadrid CT. Epidemiology of risk factors for age-related cataract. *Surv Ophthalmol*. 1995;39(4):323–34.
15. Periyasamy P, Shinohara T. Age-related cataracts: Role of unfolded protein response, Ca²⁺ mobilization, epigenetic DNA modifications, and loss of Nrf2/Keap1 dependent cytoprotection. *Prog Retin Eye Res*. 2017 Sep;60:1-19.
16. Tsentelovich . P., Verkhovod T.D. Yanshole V.V., Kiryutin A.S., Yanshole L. V., Fursova A.Z., Stepanov D.A., Novoselov V.P., Sagdeev R.Z. Metabolomic composition of normal aged and catara
17. Clayton RM, Cuthbert J, Phillips CI, Bartholomew RS, Stokoe NL, Ffytche T, et al. Analysis of individual cataract patients and their lenses: a progress report. *Exp Eye Res*. 1980;31(5):553–66.
18. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(12):1013–30.
19. Lee J, Ozcan U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem*. 2014;289(3):1203–11.
20. Sharma KK, Santhoshkumar P. Lens aging: effects of crystallins. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(10):1095–108.
21. Pescosolido N, Barbato A, Giannotti R, Komaiha C, Lenarduzzi F. Age-related changes in the kinetics of human lenses
22. Chen W, Tan X, Chen X. Anatomy and physiology of the crystalline lens. In: *Pediatric Lens Diseases*. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 21–8.
23. Truscott RJ. Age-related nuclear cataract: a lens transport problem. *Ophthalmic Res*. 2000;32(5):185–94.

24. Lin D, Lobell S, Jewell A, Takemoto DJ. Differential phosphorylation of connexin46 and connexin50 by H₂O₂ activation of protein kinase Cγ. *Mol Vis*. 2004;10:688–95.
25. Zampighi GA, Planells AM, Lin D, Takemoto D. Regulation of lens cell-to-cell communication by activation of PKCγ and disassembly of Cx50 channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(9):3247–55.
26. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(4):C849-68.
27. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.
28. Ho M-C, Peng Y-J, Chen S-J, Chiou S-H. Senile cataracts and oxidative stress. *J Clin Gerontol Geriatr*. 2010;1(1):17–21.
29. Rong X., Qiu X., Jiang Y., Li D., Xu J., Zhang Y., Lu Y. Effects of histone acetylation on superoxide dismutase 1 gene expression in the pathogenesis of senile cataract. *Sci. Rep*. 2016; 6, 34704.
30. Babizhayev MA, Deyev AI, Yermakova VN, Brikman IV, Bours J. Lipid peroxidation and cataracts: N-acetylcarnosine as a therapeutic tool to manage age-related cataracts in human and in canine eyes. *Drugs R D*. 2004;5(3):125–39.
31. Sreelakshmi V and Abraham A. Age Related or Senile Cataract: Pathology, Mechanism and Management. *Austin J Clin Ophthalmol*. 2016; 3(2): 1067. ISSN : 2381-9162
32. Wilson DM 3rd, Sofinowski TM, McNeill DR. Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front Biosci*. 2003;8(4):d963-81. Tafurt Y, Marin MA. Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud* 2014; 13(2): 95-110.

33. Frosina G. Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA: Overexpression of DNA repair enzymes. *Eur J Biochem.* 2000;267(8):2135–49.
34. Frosina G. Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA: Overexpression of DNA repair enzymes. *Eur J Biochem.* 2000;267(8):2135–49.
35. Su S, Yao Y, Zhu R, Liang C, Jiang S, Hu N, et al. The associations between single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes, DNA damage, and age-related cataract: Jiangsu Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(2):1201–7.
36. Zhang, Y., Zhang L., Song Z., Lin D., Ruo H., Bin Fu S., Rui D., Liu P. Genetic Polymorphisms in DNA Repair Genes OGG1, APE1, XRCC1, and XPD and the Risk of Age-Related Cataract. *phtha.*2011 (11) 004. 900-906
37. Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, et al. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J.* 1994;13(10):2388–92.
38. Clarkson SG, Wood RD. Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal. *DNA Repair (Amst).* 2005;4(10):1068–74
39. Unal M, Güven M, Batar B, Ozaydin A, Sarici A, Devranoğlu K. Polymorphisms of DNA repair genes XPD and XRCC1 and risk of cataract development. *Exp Eye Res.* 2007;85(3):328–34.
40. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol.* 2007;1(1):19–25.
41. Qiu X, Rong X, Yang J, Lu Y. Evaluation of the antioxidant effects of different histone deacetylase inhibitors (HDACis) on human lens epithelial cells (HLECs) after UVB exposure. *BMC Ophthalmol.* 2019;19(1):42.

42. López Valverde G., Garcia Martin E., Fernández Mateos J., Cruz González F, Larrosa Povés J.M., Polo Llorens V., Pablo Júlvez L.E. Study of association between pre-senile cataracts and rs11615 of ERCC1, rs13181 of ERCC2, and rs25487 of XRCC1 polymorphisms in a Spanish population, *Ophthalmic Genetics*; 2017, 38. 4, 314-319
43. Zurita M., Cruz G. TFIH: New Discoveries Regarding its Mechanisms and Impact on Cancer Treatment. *J Cancer*. 2016; 7(15): 2258-2265.
44. Jiang J., Zhou J., Yao Y., Zhu R., Liang C., Jiang S., Yang M., Lu Y., Xing Q., Guan H. Copy number variations of DNA repair genes and the age-related cataract: Jiangsu Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Feb 1;54(2):932-8.
45. Asbell PA, Dualan I, Mindel J, Brocks D, Ahmad M, Epstein S. Age-related cataract. *Lancet* 2005; 365:599-609
46. Narthey A. The pathophysiology of cataract and major interventions to retarding its progression: A mini review. *Adv ophthalmol vis syst*. 2017;6(3):62–5.
47. Barroso Peña Y, Ávila Balmaseda Y, Rodríguez Bencomo, Rodríguez Romero A. Características clínico epidemiológicas de la catarata. *Archivo Médico de Camaguey*. 2010, Vol. 14 (2)
48. Martínez Lamas M., Suárez Rodríguez A., Caracterización clínico epidemiológica de los pacientes con catarata senil en el estado venezolano de Sucre. *MEDIOSAN* 1014., 18(12): 2015: 1697-1702.
49. Rao RV, Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):653–62.
50. Amen OM, Sarker SD, Ghildyal R, Arya A. Endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response signaling and mediates inflammation, obesity, and cardiac dysfunction: Therapeutic and molecular approach. *Front Pharmacol*. 2019;10:977.

51. Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Haris EL, Sanford KK, Bell DA. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 2000; 21:551-5.
52. Worgul BV, David J, Odrich S, Merriam GR Jr, Medvedovsky C, Merriam JC, Trokel SL, Geard CR. Evidence of genotoxic damage in human cataractous lenses. *Mutagenesis* 1991; 6:495-9.
53. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22(3):193–201.