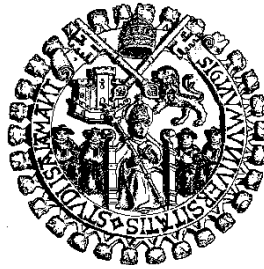


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA (OFTALMOLOGÍA) Y

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR.

FACULTAD DE MEDICINA



NUEVAS APORTACIONES A LA CORRELACIÓN CLÍNICO

MOLECULAR DE LA CATARATA SENIL

Dña. Ana Sánchez – Jara Sánchez

2009



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Cirugía

SECRETARÍA

D. Clemente Muriel Villoria, Director del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Informa:

Que el trabajo por Dña. Ana Sánchez – Jara Sánchez, titulado: “Nuevas Aportaciones a la Correlación Clínico – Molecular de la Catarata Senil”

Reune las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía por esta Universidad.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firma el presente certificado en Salamanca 17 de Diciembre de 2009

D. Clemente Muriel Villoria



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Cirugía

SECRETARÍA

Prof. Dr. D. Rogelio González Sarmiento. Catedrático de Medicina Molecular.
Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Prof. Dr. D. Emiliano Hernández Galilea. Profesor Titular de Oftalmología.
Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Informan:

Que el trabajo realizado por Dña. Ana Sánchez – Jara Sánchez, titulado “Nuevas Aportaciones a la Correlación Clínico – Molecular de la Catarata Senil” para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firman el presente certificado en Salamanca 17 de Diciembre de 2009

Prof. Dr. D. Rogelio González Sarmiento

Prof. Dr. D. Emiliano Hernández Galilea

INDICE

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Factores moleculares implicados en el desarrollo del cristalino	22
1.2. Estructura bioquímica del cristalino	24
1.3. Transparencia del cristalino	32
1.4. El proceso de opacificación del cristalino: La Catarata	35
1.5. Epidemiología de la catarata	41
1.6. Genética de la catarata senil	48
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	74
3. PACIENTES Y MÉTODOS	77
3.1. Pacientes	78

3.2. Estudio genético	80
3.2.1. Extracción de DNA	81
3.2.2. Discriminación alélica	84
3.2.2.1. PCR: GSTT y GSTM	84
3.2.2.2. Endonucleasas de restricción:	88
A. MTHFR	88
B. Oxido Nítrico	96
3.3. Estudio Estadístico	105
4. RESULTADOS	109
4.1. Resultados clínicos	110
4.1.1. Sexo	111
4.1.2. Edad	113
4.1.3. Metabolismo del hierro	116
4.1.4. Resultados oftalmológicos	121
4.1.4.1. Presión intraocular	121
4.1.4.2. Agudeza visual	123

4.1.5. Factores de Riesgo	126
4.1.5.1. Hipertensión	134
4.1.5.2. Diabetes Mellitus	135
4.1.5.3. Hábito Tabáquico	136
4.1.5.4. Hábito Alcohólico	137
4.1.5.5. Exposición a Luz Ultravioleta	138
4.1.5.6. Exposición a Calor local	140
4.2. Estudio Genético	141
4.2.1. Glutación –S-Transferasa	148
4.2.1.1. GSTT	148
4.2.1.2. GSTM	149
4.2.2. Metilen-Tetra-Hidro-Folato-Reductasa	150
4.2.2.1. rs 180133 (677C>T)	150
4.2.2.2. rs 180131 (1298A>C)	151
4.2.3. Sintetasa de NO Endotelial (NOS3)	152
4.2.3.1. rs 2070744 (-786TC)	152

4.2.3.2. rs 1799983 (Glu298Asp)	153
5. DISCUSIÓN	155
5.1. Estudio Clínico	156
5.2. Estudio Genético	170
6. CONCLUSIONES	176
7. BIBLIOGRAFÍA	179

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis el Dr. Rogelio González Sarmiento y Dr. Emiliano Hernández Galilea, por su dedicación y su paciencia desde el principio de este proyecto, y por poner tanta ilusión con el tema.

A todo el personal del laboratorio de Medicina Molecular, sobre todo a Sara y a Nieves sin cuya inestimable ayuda no podría haber terminado este estudio.

A todos mis compañeros del servicio de Oftalmología, médicos y enfermeras, tanto de la consulta como del quirófano por ayudarme a recopilar muestras de todos los pacientes.

A mi amiga Ana Dorado por dedicarme pacientemente su tiempo y sus conocimientos estadísticos.

A mi padre por haberme introducido en el mundo de la medicina en general y de la oftalmología en particular y haberme insistido en hacer las cosas bien, a mi madre por haberme ayudado tanto y haberme servido de desahogo en los momentos de nervios y a mi hermano por todos estos años compartidos con la medicina.

Y por supuesto a mi marido, Jorge y a mi hija, Amelia, por tener tanta paciencia y darme tanto cariño cuando más lo necesitaba, y también a mi futura hija que viene en camino, por darme fuerza para terminar este estudio antes de que ella llegue.

Sin todos ellos este trabajo de más de cuatro años no hubiera sido posible.

ABREVIATURAS

- aa: Aminoácidos
- A: Adenina
- Asp: Aspártico
- ATP: Adenosín Trifosfato
- BMP-4: Bone Morphogenetic Protein-4
- BSA: Albúmina Sérica Bovina
- C: Citosina
- C: Cortical
- CIAA: Cloroformo Alcohol Isoamílico 24:1
- CTP: Citosina Trifosfato
- ddH₂O: Agua Bidestilada
- DM: Diabetes Mellitus
- DNA: Acido Desoxiribonucleico
- dUMP: Desoxiuridilato Monofosfato
- EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
- eNos: Oxido Nítrico Sintasa Endotelial
- EYA: Eye Absent
- FADH: Flavin Adenin Dinucleótido
- Fe²⁺: Hierro
- FOX-3: DNA segment, Chr 11, Brigham & Women's Genetics
0517 Expressed

-Glu: Glutámico

-Grs: gramos

-GSH: Glutation

-GST: Glutation Transferasa

-GTP: Guanosín Trifosfato

-G: Guanina

-HCys: Homocisteina

-H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

-HOX11L1: TLX1: T Cell Leukemia Homeobox 1

-HTA: Hipertensión Arterial

-iNos: Oxido Nítrico Sintasa Inducible

-K⁺: Potasio

-KB: Kilobases

-KCl: Cloruro Potásico

-KD: Kilodaltons

-LMAF: Neural Retina Leucina Zipper

-LOCS: Lens Opacification Clasification System

-M: Molar

-M.E.: Microscopía Electrónica

-MgCl₂: Cloruro de Magnesio

-μl.: Microlitro

-μmol/l.: Micromol por Litro

-MIP: Proteína Intrínseca Mayor

-ml: mililitros

-Mm.: milímetros

-mM: miliMolar

-mRNA: RNA Mensajero

-MTHFR: Metilen Tetrahydrofolato Reductasa

-Na⁺: Sodio

-NADPH: Nicotín Adenin Dinucleótido Fosfato

-Nc: Coloración Nuclear

-Nm: Nanómetros

-nNos: Oxido Nítrico Sintasa Neuronal

-NO: Opacidad Nuclear

-NO: Oxido Nítrico

-NO₂: Nitrito

-NO₃: Nitrato

-Nos: Oxido Nítrico Sintasa

-O₂: Oxígeno

-P: Capsular Posterior

-pb: Pares de Bases

-PAS: Peryodic Acid Schiff

-PAX: Paired Box Gene 6

-PM: Peso Molecular

-Radicales OH: Radicales Hidroxilo

-RNA: Acido Ribonucleico

- R.p.m.: Revoluciones por Minuto
- SAH: S-Adenosil Homocisteina
- SAM: S-Adenosil Metionina
- SDS: Sodium Dodecil Sulfato
- SIX: Baculoviral IAP repeat-containing expressed 5, gene 2
- SOX: SRY (Sex Determining Region Y)-box-2
- T: Timina
- TLX2: T Cell Leukemia Homeobox 2
- TMP: Timidilato Monofosfato
- Tris: Hidroximetil Aminometano
- Tris HCl : Tris- Hidrocloruro
- TTP: Trifosfato
- UV: UltraVioleta

1. INTRODUCCIÓN

El cristalino, es una estructura intraocular, transparente, con morfología de lente biconvexa, situada en el eje visual, por detrás del iris y suspendida por la zónula. No contiene nervios ni aporte sanguíneo. Se nutre a través del humor acuoso y del humor vítreo; posee una consistencia blanda y elástica, que sufre un progresivo endurecimiento con la edad (Honrubia F.M. 2002); (Tripathi and Tripathi 1983).

Su función es fundamentalmente refractiva, actuando en la acomodación como una lente de dioptrías variables.

El desarrollo del globo ocular se pone de manifiesto por primera vez al principio de la cuarta semana, cuando aparecen los surcos ópticos en los pliegues neurales, a nivel del extremo caudal del embrión. A medida que los pliegues neurales se van fusionando y forman el encéfalo anterior, los surcos ópticos se transforman en dos vesículas ópticas, que se proyectan de los costados del encéfalo anterior.

A medida que las vesículas ópticas crecen hacia fuera, el ectodermo superficial de las vesículas se espesa y forma la placoda del cristalino; esta sufre una invaginación y se convierte en la fosita del cristalino. Los bordes

de la fosita se acercan y se fusionan para formar la vesícula del cristalino (futura cápsula del cristalino, una monocapa de células cuboidales con membrana basal). En las vesículas ópticas ocurre una invaginación que dará origen a la cúpula óptica de doble capa. Es entonces cuando las vesículas del cristalino se separan del ectodermo superficial y en los tallos ópticos se desarrollan surcos lineales, llamados fisura óptica. Del mesénquima de éstas fisuras se desarrollan los vasos sanguíneos hialoideos, formados al final del primer trimestre, que posteriormente se van atrofiando hasta el final del 7° mes, quedando sólo como vestigio del denominado canal de Cloquet (Persaud, Moore 1999); (Langman 2007).

El cristalino se desarrolla a partir de la vesícula del cristalino. La pared anterior de esta vesícula se convierte en el epitelio del cristalino. La vesícula es hueca con paredes formadas por células cilíndricas ectodérmicas, que se sitúan en la pared posterior y se van extendiendo hasta la pared anterior (fibras primarias) (figura 1) con gran actividad mitótica y constituidas en más de un 90% por proteínas cristalinas α , β , y γ (Lorente, Mendicute 2008).

Durante el desarrollo embrionario, las células cilíndricas de la pared anterior muestran actividad mitótica pero con el desarrollo este proceso se va limitando a las situadas cerca del ecuador que se dividen (fibras

secundarias) (Tripathi and Tripathi 1983) disponiéndose como capas de cebolla durante toda la vida sobre las primarias (Lorente, Mendicute 2008); así las periféricas de las células del epitelio anterior van a formar el cortex y las centrales, que han perdido actividad mitótica, formarán el núcleo (Kuszak, Zoltoski et al. 2004).

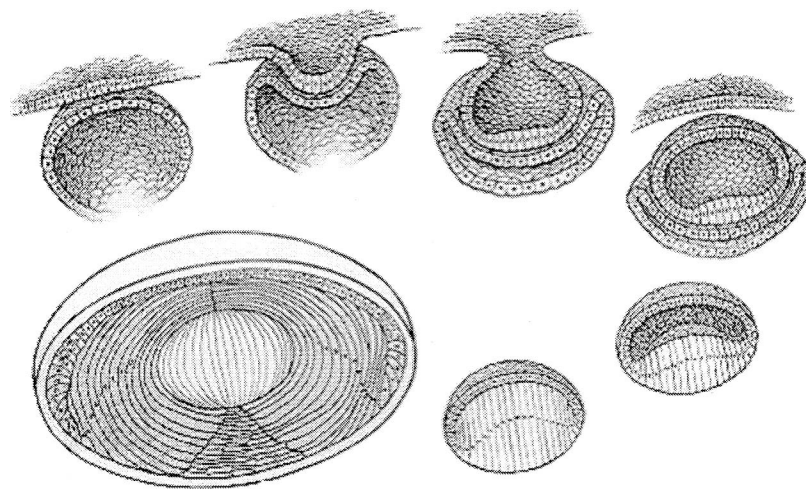


Figura 1: Desarrollo embriológico de la vesícula cristalina.

El cristalino en desarrollo se encuentra irrigado por la parte distal de la arteria hialoidea; no obstante, se torna avascular en el periodo fetal. Más tarde el cristalino dependerá de la difusión del humor acuoso y del humor vítreo. La membrana basal original del cristalino prolifera constituyendo la cápsula del mismo (Lorente, Mendicute 2008).

Macroscópicamente (figura 2), el cristalino tiene forma biconvexa, el polo anterior es elipsoideo y el polo posterior es más curvo, pesa 65 grs. en el nacimiento y unos 250 grs. en la edad adulta y mide 6,4mm. -3,5mm. en el nacimiento y 9,7mm.-6,8mm. en el adulto (Glasser and Campbell 1999). Presenta una potencia refractiva de 15 a 20 dioptrías y su curvatura aumenta con la edad disminuyendo el índice de refracción por el aumento de proteínas insolubles (Tripathi and Tripathi 1983).

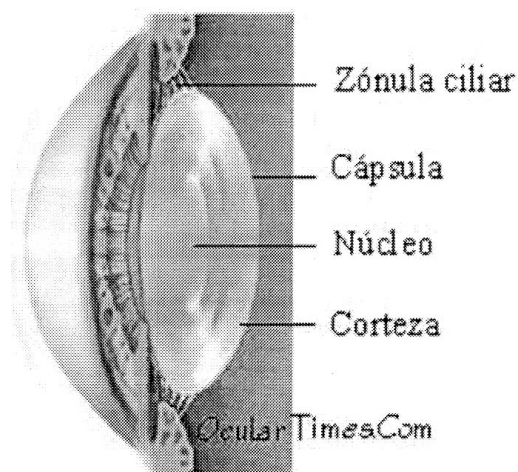


Figura 2: Estructura macroscópica del cristalino.

Histológicamente pueden diferenciarse 4 estructuras en el cristalino adulto: cápsula, epitelio subcapsular, córtex y núcleo.

La cápsula es la membrana basal de las células epiteliales y está compuesta de colágeno tipo I, II, IV, y laminina, inmersos en un

componente de glucoproteínas y glucosaminoglicanos (entactina, proteoglicano, heparansulfato, y fibronectina) con características metacrómicas para la tinción, basófila y PAS+ (Parmigiani and McAvoy 1984); (Parmigiani and McAvoy 1989).

La cápsula anterior aumenta de grosor con la edad. La zona más gruesa es la preecuatorial y la más fina la posterior; a través de ella existe un paso de agua y electrolitos. Presenta una gran elasticidad debida a la disposición de las fibrillas (Tripathi and Tripathi 1983).

El epitelio subcapsular, se encuentra en la porción anterior de la cápsula y en la zona ecuatorial pero está ausente en la posterior, debido a que a partir de este epitelio se formaron las fibras primarias durante el desarrollo. Esta capa epitelial está formada por una monocapa de células cúbicas unidas entre sí por uniones tipo ocludens. En general presentan pocas organelas y gran cantidad de microtúbulos y filamentos. A nivel ecuatorial existen gran cantidad de uniones intercelulares (interdigitaciones, zónulas-occludens y mácula-adherens) (Tripathi and Tripathi 1983).

En función de la localización presenta distintas características histológicas (Harding, Reddan et al. 1971):

-Zona central: Células poligonales ó cúbicas, en fase G0 del ciclo, no existe mitosis, excepto tras estímulo, como la cirugía de la catarata.

-Zona intermedia o pregerminal: Células cilíndricas, sufren algunas mitosis para formar fibras secundarias.

-Zona ecuatorial o germinal: Células se dividen y alargan en el ecuador del cristalino, formando también parte de las fibras secundarias.

La zona germinal y pregerminal suponen el 90% de las fibras del epitelio.

El cortex está formado por fibras hexagonales superpuestas en capas de cebolla que derivan de células epiteliales hexagonales (entre 2100 y 2300); en la zona cortical son nucleadas y pierden sus organelas según pasan a formar parte del núcleo y lo hacen en forma de Y en las líneas de sutura, una anterior y otra posterior.

La capacidad de acomodación depende en parte de la consistencia del cortex, blando y flexible en la juventud y con la edad disminuye su flexibilidad al ir ocupando el núcleo la mayor parte del cristalino (Tripathi and Tripathi 1983).

El núcleo constituye la zona central del cristalino formada por aposición de unas 22.000 capas de fibras. Es más denso que la corteza porque las fibras están estrechamente unidas hacia el interior. Las células pierden su núcleo, sus lípidos y el contenido líquido que contienen y se van solidificando por deshidratación.

Las proteínas que forman parte del mismo son: escleroproteína (albuminoide) y diversas albúminas y globulinas, las primeras aumentan con la edad y son responsables de la opacidad central del cristalino. La lecitina y el colesterol aumentan igualmente con la edad, por eso aparecen cristales de colesterol en las cataratas (Tripathi and Tripathi 1983).

En relación con el desarrollo y con los criterios de crecimiento (Garland, Duglas-Tabor et al. 1996) el núcleo está dividido:

-Núcleo embrionario, compuesto de fibras primarias.

-Núcleo fetal, compuesto del núcleo embrionario y las fibras secundarias que se van acumulando progresivamente hasta el parto.

-Núcleo infantil, compuesto por el núcleo fetal y las fibras secundarias que se acumulan sobre este hasta los cuatro años de vida.

-Núcleo juvenil, compuesto por el núcleo infantil y las fibras secundarias acumuladas sobre él hasta la madurez sexual.

El cristalino senil está formado por el núcleo juvenil y las fibras secundarias acumuladas sobre él hasta la edad adulta (Garland, Douglas-Tabor et al. 1996); (Kuszak, Ennesser et al. 1988).

1.1. FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CRISTALINO

Todos los cambios que se producen en la forma y configuración del cristalino se deben a la expresión de distintos genes (Ogino and Yasuda 2000). En el caso del cristalino estos genes no son específicos, también participan en el desarrollo de otros órganos (Chow and Lang 2001).

El PAX-6 es el gen regulador de la morfogénesis del ojo en los vertebrados e invertebrados (Cvekl, Yang et al. 2004); (Cvekl and Duncan 2007), y su expresión es necesaria, aunque no suficiente para el proceso de inducción; así PAX-6 regula positivamente la expresión de SOX-2 en el futuro cristalino, en tanto que BMP-4, secretado por la vesícula externa, regula positivamente el factor de transcripción LMAF. La expresión

combinada de PAX-6, SOX-2 y LMAF da comienzo a la expresión de los genes responsables de la formación de las proteínas del cristalino. Finalmente, PAX-6, a través de FOX-3, regula la proliferación celular en el cristalino (Langman 2007).

Se ha verificado igualmente en el cristalino embrionario la expresión del gen HOX11L1 que se silenciaría tras el nacimiento (Hernandez-Galilea, Gonzalez-Sarmiento et al. 2003); este mismo gen parece que codifica proteínas como la TLX2 en el cristalino embrionario del ratón y que así mismo se silenciaría tras el nacimiento (Guarnieri, Hernandez-Galilea et al. 2009).

En humanos se han identificado otros dos genes: EYA (*eyes absent*) y SIX (*sine oculis*) los cuales son activados por PAX-6. En todos los experimentos para determinar las características genéticas se verificó que la falta de expresión del PAX-6 detenía el desarrollo ocular (Reza, Ogino et al. 2002); (Donner, Ko et al. 2007).

1.2. ESTRUCTURA BIOQUÍMICA DEL CRISTALINO

En el cristalino humano existe una concentración de proteínas del 33% de su peso húmedo que representa, como mínimo, el doble que en la mayoría de los tejidos. Las proteínas lenticulares suelen agruparse en dos categorías, según su solubilidad en agua (figura 3). La fracción hidrosoluble del cristalino joven da cuenta del 80% de las proteínas lenticulares y se compone sobre todo de un grupo de proteínas denominadas cristalinas.

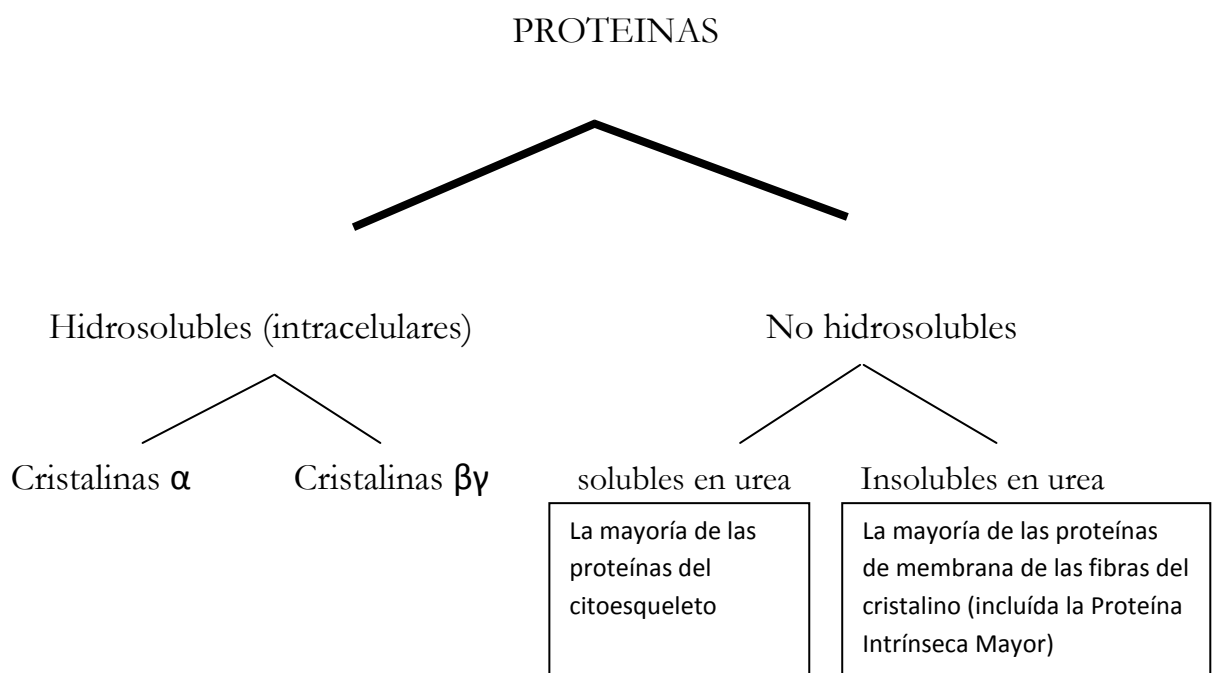


Figura 3: Distribución de proteínas cristalinas.

El citoesqueleto del cristalino sostiene la arquitectura celular, especialmente el filamento arrosariado (beaded filament), que parece único para el cristalino, y que puede interactuar con la cristalina α (Alcala, Cenedella et al. 1985); (Marchesi 1985).

El filamento arrosariado está compuesto por proteínas globulares de 12-15 nm. unidas a una proteína filamentosa de 7-9 nm. (Benedetti, Tagliamonte et al. 1981). La hebra filamentosa central está compuesta por una proteína de 115-KD que se llama filensina o CP-115, mientras que las partículas globulares contienen CP-115 y una proteína de 49-KD que se llama phakinina o CP-49 (Ireland and Maisel 1984); (Goulielmos, Kiliyas et al. 1986); (Hess, Casselman et al. 1998). Ambos componentes sufren modificaciones posttraduccionales, responsables de la formación de cataratas. Los filamentos arrosariados no están presentes en las células epiteliales anteriores, pero sí en las fibras.

Las proteínas de la membrana aunque no constituyen más del 1% del peso del cristalino, son importantes para las funciones del cristalino, proporcionando osmoregulación y ayudando a mantener el ambiente intracelular. Las cristalinas- α y δ , y las proteínas del citoesqueleto, se pueden asociar a la membrana (Alcala, Cenedella et al. 1985).

La Proteína intrínseca mayor (Major Intrinsic Protein), también denominada MP26, es una proteína integral específica de las membranas de las fibras del cristalino (Benedetti, Tagliamonte et al. 1981); (Alcala, Cenedella et al. 1985); (Chepelinsky, Piatigorsky et al. 1991) que está formada por seis segmentos helicoidales transmembranosos (Gorin, Yancey et al. 1984).

La proteína MP26 se encuentra en las uniones estrechas (tight junctions) (11-13 nm), que están presentes en membranas aisladas y en áreas de unión entre las células (Zampighi, Hall et al. 1989). La proteína MP26 puede formar canales de agua y pequeñas moléculas entre el espacio extracelular y el citoplasma, posiblemente proporcionando conexiones indirectas, ayudando a minimizar el espacio extracelular y a realzar la transparencia del cristalino. La proteína MP26 se degrada con el envejecimiento del cristalino. El gen humano que codifica la proteína MP26 se localiza en el cromosoma 12q13 (Pisano and Chepelinsky 1991).

La proteína MP70, también conocida como conexina 50 o proteína alfa del canal de unión de hendidura de la membrana (gap junction membrana channel protein alpha 8-GJA8), es una proteína intrínseca de la membrana que se localiza en las uniones de hendidura (16-17 nm.) (Gruijters, Kistler et al. 1987); (Kistler and Bullivant 1988) en zonas de

aposición de la membrana plasmática de dos células hay estructuras proteicas enfrentadas que pueden formar un canal, que abierto comunica los citoplasmas de las células. La proteína MP70 se degrada con el envejecimiento, especialmente en el núcleo del cristalino (Kistler, Berriman et al. 1990). El gen de la proteína MP70 se localiza en el cromosoma 1 y está contenido por un único exón, como es habitual en los genes que codifican las conexinas (Church, Wang et al. 1995).

La proteína MP20, que también se llama MP19, es una proteína intrínseca de la membrana. Es la segunda proteína más frecuente de las proteínas de la membrana. La N-cadherina, se encuentra en las fibras corticales y nucleares de los cristalinos de los neonatos. Esta proteína no está presente en los cristalinos más seniles (Atreya, Barnes et al. 1989).

Las cristalinas son las proteínas más abundantes del cristalino, constituyendo entre el 80 y el 90% de las proteínas solubles del cristalino. Clásicamente, las cristalinas están divididas en dos familias principales, α y (β - γ), que están presentes en todos los cristalinos de los vertebrados. Hay también un número creciente de cristalinas específicas de especies, que se denominan taxón-específicas (taxon-specific crystallins) son enzimas aunque su función es estructural. Además dentro de cada familia de cristalinas hay también heterogeneidad (Wistow and Piatigorsky 1988).

Cristalina	cromosoma
Cristalina- α A	21q22.3
Cristalina- α B	11q22.3-q23.1
Cristalina- β A1-A3	17q11.1-q12
Cristalina- β A2	2q34-q36
Cristalina- β A4	22q11.2-q12.1
Cristalina- β B1	22q11.2-q12.1
Cristalina- β B2	22q11.2-q12.1
Cristalina- β B3	22q11.2-q12.1
Cristalina- δ A	2q33-q35
Cristalina- δ B	2q33-q35
Cristalina- δ C	2q33-q35
Cristalina- δ D	2q33-q35
Cristalina- δ γ E	2q33-q35

Cristalina- $\delta\gamma$ F	2q33-q35
Cristalina- $\delta\gamma$ G	2q33-q35
Cristalina- γ s	3pter

Las cristalinas- α , se sintetizan en el epitelio lenticular durante los primeros estadios del desarrollo del cristalino. Son las de mayor peso molecular de todas las cristalinas. La familia de las cristalinas- α está codificada por dos genes similares que codifican dos proteínas distintas en los humanos. El gen de la cristalin- α A, es relativamente específico para el cristalino, aunque también se expresa, en niveles bajos, en el bazo y el timo (Overbeek, Chepelinsky et al. 1985). Así también el gen de la cristalina- α B, además de expresarse en niveles altos en el cristalino, también se expresa en niveles bajos en otros tejidos (Dubin, Wawrousek et al. 1989); (Bhat and Nagineni 1989).

Las cristalinas- α , representan el 50% o más de las proteínas solubles en los cristalinos de mamíferos. Las cristalinas- α A y - α B muestran 55% de identidad de secuencia. Las cristalinas- α , pueden actuar como moléculas

denominadas chaperoninas, que hacen que las proteínas se plieguen de manera correcta y que no se desnaturalicen cuando son sometidas a distintos tipos de estrés: térmico, oxidativo, fotoquímico, etc. Las cristalinas- α pueden ser consideradas como miembros de la familia de proteínas tipo heat-shock, o proteínas de choque térmico, que las células sintetizan para neutralizar los efectos de la temperatura.

La alteración del gen de la cristalina- α A se asocia con el desarrollo de cataratas por la presencia de cuerpos de inclusión compuestos primariamente de cristalinas- α B en las células lenticulares (Brady, Garland et al. 1997). En contraste, la alteración del gen de la cristalina- α B, no se asocia con ningún fenotipo detectable.

Las cristalinas- β están relacionadas con las cristalinas- γ por la secuencia, y la estructura del gen y de la proteína (Driessen, Herbrink et al. 1981); (Inana, Piatigorsky et al. 1983). Las cristalinas- β son características de las fibras y se sintetizan tardíamente durante el proceso de elongación y diferenciación. Son parte importante de la fracción soluble en agua donde forman agregados de bajo peso molecular. Probablemente hay siete genes que codifican las cristalinas- β .

Ambas cristalinas- β y $-\gamma$ tienen un centro globular (Wistow, Slingsby et al. 1981); (Inana, Shinohara et al. 1982) que está formado por dos dominios, comunes para ambas cristalinas, compuestos de cuatro estructuras en forma de hoja plegada denominados dominios Greek-Key motifs (Blundell, Lindley et al. 1981) .

Las cristalinas γ son las menos abundantes y las de menor peso molecular de las proteínas solubles, están formadas por monómeros (no se asocian entre sí, ni con otras proteínas), se localizan sobre todo en el núcleo, y están codificadas por cuatro genes.

Las cristalinas- γ C, $-\gamma$ D, y $-\gamma$ s constituyen la mayoría de las cristalinas- γ en el cristalino humano. Las cristalinas- γ , con la excepción de la cristalinas- γ s se sintetizan en los estadios primitivos del desarrollo del cristalino (White, Driessen et al. 1989). La cristalina- γ s tiene las características de ambas cristalinas- β y $-\gamma$. La estructura del gen de la cristalina- γ s es similar a la del gen de las cristalinas- γ . La síntesis de las γ s ocurre a una edad más tardía así que puede encontrarse igualmente en el cortex.

Aunque muchas de las cristalinas- $\beta\gamma$ son específicas para el cristalino, varias cristalinas- $\beta\gamma$ han sido detectadas en varios tejidos no lenticulares (Smolich, Tarkington et al. 1994); (Dirks, Van Genesen et al. 1998).

Otro tipo de cristalinas son las llamadas cristalinas taxón-específicas, están muy relacionadas con enzimas funcionales que se encuentran en concentración baja en los tejidos extralenticulares, por lo que se llaman también cristalinas enzimáticas. Estas cristalinas no están presentes en el cristalino para actuar como enzimas, sino que se suman a la mayoría de la estructura refractiva del cristalino (De Jong, et al.1989); (Piatigorsky, Kantorow et al. 1994). Muchas de estas cristalinas son óxidoreductasas que ayudan a mantener el ambiente reducido en el cristalino, lo que favorece el reclutamiento de las óxidoreductasas como cristalinas lenticulares (Zigler and Rao 1991).

1.3. TRANSPARENCIA DEL CRISTALINO

En el ojo penetra la luz visible (400- 750 nm. de longitud de onda) con el objetivo de estimular los fotorreceptores de la retina y que comience el fenómeno de la visión. La córnea es capaz de absorber la de menor longitud de onda (< 295 nm.) y el cristalino entre 295-400 nm. (luz U.V.).

La luz visible puede no llegar a la retina porque sea sometida a dos fenómenos: Absorción y dispersión. En el primer caso la luz pasa de un estado a otro de menor energía, con el tiempo y debido a que el cristalino es avascular (utiliza el metabolismo anaeróbico de la glucosa) podría influir sobre los pigmentos de envejecimiento pero no sobre la transparencia. En el caso de la dispersión resulta todo más complejo, al tener el cristalino una alta concentración de proteínas, facilita el orden estructural, la estructura se compacta y la dispersión es mínima, respecto a la situación en que la concentración de proteínas es baja y cada centro de dispersión se mueve con libertad respecto a los otros, produciendo dispersión máxima. Además la intensidad de la luz dispersada aumenta con la concentración y el peso molecular de la partícula. Estos fenómenos pueden producir turbidez y disminución de la transparencia.

La capacidad del cristalino de refractar y enfocar la luz sobre la retina requiere que tenga contenido de proteínas alto, hasta de un 60% del peso, tal vez el contenido de proteínas más alto de cualquier otro tejido (J.Fielding and J. Piatigorsky 2000). Esto hace que el índice de refracción, necesario para el enfoque de imágenes, sea máximo en el núcleo, donde existe mayor concentración proteica. La estructura transparente de las fibras cristalinas depende de muchos factores entre los que podemos citar (Bettelheim and Chylack 1985); (Slingsby, Driessen et al. 1988):

-El peso molecular de las proteínas del cristalino.

-La concentración y la fracción del volumen de las proteínas.

-Las interacciones moleculares que determinan la organización de las proteínas dentro del plasma.

Estas proteínas incluyen todas las nombradas anteriormente: las cristalinas; las proteínas del citoesqueleto, especialmente los filamentos arrosariados (Carter, Hutcheson et al. 1995); las proteínas de la membrana como MP26 y aquaporinas presentes en las uniones estrechas (tight junctions); las conexinas y N-cadherina que se localizan en las uniones de hendidura que proporcionan la osmoregulación y ayuda a mantener al ambiente intracelular (Gruijters, Kistler et al. 1987). Otras proteínas, como la catalasa y las reductasas de glutatión (GSH), son importantes para mantener el ambiente reducido del cristalino (Spector 1995).

Finalmente, la regulación del desarrollo del cristalino a través de factores de transcripción como Pax-6 es determinante para la formación de la arquitectura del cristalino (Cvekl and Piatigorsky 1996). Además las fibras diferenciadas profundas son transparentes.

1.4. EL PROCESO DE OPACIFICACIÓN DEL CRISTALINO: LA CATARATA

Se denomina catarata a la pérdida de transparencia del cristalino y es considerada la causa más frecuente de ceguera reversible en el mundo (Brian and Taylor 2001); (Sturmer 2009). Las clasificaciones son muy variadas y se superponen unas con otras (Datiles Manuel B., Benjamin V.M.): Clínicamente se dividen en función de la edad de aparición en, congénitas, juveniles y seniles; Biomicroscópicamente se clasifican en función del lugar opacificado en nuclear, cortical anterior y posterior, y subcapsular anterior y posterior. Respecto a este último vamos a referirnos a algunos de los sistemas clásicos de clasificación:

The Lens Opacities Classification System (LOCS); ha ido evolucionando en los últimos años hasta el LOCS III que es el más actual:

-LOCS I (Leske, Wu et al. 1995): dividía las cataratas en corticales, subcapsulares posteriores y nucleares, y estas últimas las subdividía en función del color y la opacidad nuclear.

-LOCS II (Maraini, Pasquini et al. 1991): estratifica también la catarata cortical y subcapsular posterior.

-LOCS III (Chylack, Wolfe et al. 1993): respecto a los anteriores, ha aumentado los grados de catarata, estableciendo grados intermedios, se han expandido las escalas que definen la opacidad nuclear, valora grados más precoces de catarata subcapsular, y todo ello con una escala decimal que define muy bien el tipo y grado de catarata.

The Age-Related Eye Disease Study (AREDS) system(2001): tomando imágenes obtenidas por lámpara de hendidura y por retroiluminación, se diferencian, por un lado la opacidad nuclear (con escala numérica del 0,9 al 7,1) y por otro la opacidad cortical y subcapsular posterior (medida sobre una gradilla con distintas marcas).

The Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System (Sparrow, Bron et al. 1986): define las zonas del cristalino en función de la dispersión de la luz, dividiendo en zona nuclear y cortical y ésta dividiéndose en zonas concéntricas al núcleo, cada una de ellas con zona anterior y posterior.

Beaver Dam Eye Study (Klein, Klein et al. 1990): valoraba la esclerosis nuclear en cinco niveles y la opacidad cortical en función del área afectada.

Clasificación de Barraquer (Barraquer 2007): muy similar a la LOCS III, divide las cataratas determinando su densidad en 3 aspectos: nuclear, cortical y subcapsular posterior.

The National Eye Institute Scheimpflug system (Datiles, Magno et al. 1995), divide las cataratas en cuanto a densidad nuclear comparativamente con LOCS II y estudia si diversas medicaciones tienen efecto en disminuir esa opacidad nuclear.

Muchas de las modificaciones encontradas en cristalinos con catarata se deben a reacciones de oxidación, provocadas en muchos casos por la luz ambiental y porque la longitud de onda en la región de absorción de aminoácidos aromáticos, sobre todo el triptófano, condicionan la aparición de especies reactivas de oxígeno (Mizdrak, Hains et al. 2008).

En el cristalino existen gran cantidad de reacciones antioxidantes, favorecidas por la disminución de la concentración de oxígeno,

disminución de la concentración de hierro, aumento de la concentración de GSH sintetizada localmente, aumento de la concentración de proteínas, etc. que suceden preferentemente en la periferia.

También existen las denominadas modificaciones postsintéticas que son cambios que suceden tras la síntesis de proteínas en el cristalino, no relacionados con la oxidación, que por un lado mantienen la estructura cristaliniana y por otro atacan a las proteínas del mismo, produciendo cambios de conformación; se consideran debidos al propio envejecimiento y pueden ser: Glicosilación espontánea (van Boekel and Hoenders 1992), Carbamilación (Hook and Harding 1997), Oxidación de Tioles (Kamei 1993), Deamidación (Hains and Truscott 2007), etc. Todas ellas van a producir los siguientes cambios en el cristalino:

1. Pigmentación amarilla: En el nacimiento, existen una serie de pigmentos amarillos fluorescentes derivados del metabolismo oxidativo del triptófano (Korlimbinis and Truscott 2006) encargados de absorber la luz U.V. A (Korlimbinis, Aquilina et al. 2007), que con la edad van disminuyendo rápidamente.

2. Fluorescencia visible: Durante el envejecimiento del cristalino se genera una fluorescencia no debida a los aminoácidos aromáticos normales

(Garcia-Castineiras, Dillon et al. 1978), es decir no debida al triptófano, sino a las cristalinas que se cargan de fluoróforos y emiten luz a longitudes de onda visibles, cuando existe catarata, la adquisición de fluorescencia visible es mucho más precoz.

3. Agregación e insolubilización de proteínas: en el cristalino se diferencian distintas fracciones proteicas según su solubilidad en distintos medios, que cambian de proporción según la edad (Harding J. 1991); (Harding J. 1984); por un lado existen proteínas solubles en agua (sobre todo cristalinas) e insolubles, y estas a su vez pueden ser solubles o insolubles en urea. Las insolubles en agua aumentan con la edad y aunque parece que en cristalinos con catarata esto sucede más precozmente, no parece estar relacionada con la opacificación del cristalino (Spector 1984); (Harding J. 1991).

4. Polimerización *crosslinking*, son fenómenos que llevan en un principio a la esclerosis nuclear, progresando hacia la periferia, y suceden por aparición precoz de enlaces covalentes intra o intermoleculares (Harrington, Srivastava et al. 2007).

5. Aumento de especies proteicas acídicas: tanto con el envejecimiento normal como con la formación de cataratas, aumentan en el

cristalino especies proteicas con carga negativa (Harding J. 1991) que son precisamente las enriquecidas en pigmentos.

6. Cambios metabólicos: Existen una serie de enzimas, cuya actividad disminuye en cristalinos cataratosos (Harding J.1991), aunque también aparecen a veces en cristalinos seniles sin catarata. Por otro lado en cristalinos envejecidos tiende a aumentar el sodio y el calcio, y a disminuir la GSH, el ascorbato y el ATP; que se acelera cuando existe catarata, aunque en todos estos cambios también influyen reacciones de oxidación.

Por todo ello parece que el hecho inicial sería un cambio de conformación de las proteínas inducida por cualquiera de las modificaciones mencionadas así como alteración en la función de las mismas que producen insuficiencias funcionales y estructurales.

El proceso de envejecimiento del cristalino que da lugar a la catarata senil, está en relación con dos teorías basadas por un lado en la ruptura del equilibrio entre estos factores oxidantes y antioxidantes (Lorente y Mendicute, 2008), y por otro a las modificaciones postsintéticas (Harding 1994).

La realidad, es que ambas teorías explican el fenómeno de la cataratogénesis pues cualquiera que sea la causa de la alteración proteica, el fenómeno final acaba siendo la oxidación; si los fenómenos efectivos del núcleo contra la oxidación (ciclo redox, superóxido dismutasa y catalasa) no funcionan, se forman disulfuro proteicos y otras alteraciones que llevan a la opacificación y pigmentación del mismo (Huang, Lou et al. 1993). El tipo de catarata que se produce, no se debe al factor de riesgo que actúe sino a las células sobre las que actúe, por eso casi todas tienen un componente mixto (Lorente y Mendicute, 2008).

1.5. EPIDEMIOLOGÍA DE LA CATARATA

La catarata es un problema económico y de salud pública debido a su alta prevalencia, que se estima en un 48% de todas las cegueras del mundo, aunque se ha comprobado que más del 90% de ellas son en países en vías de desarrollo (Resnikoff, Pascolini et al. 2004). En cuanto al tipo de catarata se realizó un estudio entre 1993 y 1995 en Salisbury, Maryland, y se determinó que la nuclear era más frecuente en blancos, la cortical en Americanos Africanos y la subcapsular posterior se daba igualmente en ambas razas (West, Munoz et al. 1998).

La importancia de la catarata se debe, por un lado al tremendo gasto que supone en cuanto a diagnóstico y tratamiento y que continúa aumentando de forma exponencial y por otro a la influencia que tiene sobre la calidad de vida.

Aunque vamos a ver que la influencia es multifactorial, es importante determinar los factores de riesgo conocidos (Abraham, Condon et al. 2006):

La **diabetes mellitus**; por dos mecanismos, uno osmótico, que hidrata las fibras cristalinas y es reversible al principio (Butler 1994) y otro, que modifica las proteínas volviéndolas insolubles, provocando que precipiten y formen opacidades (Zarina, Zhao et al. 2000) y que es el responsable de las cataratas seniles, más prevalentes en pacientes diabéticos.

Existen 3 estudios que relacionan la diabetes con la catarata senil: el *Beaver Dam Eye Study*, en el cual se relaciona la diabetes con la opacidad cortical y subcapsular posterior (Klein, Klein et al. 1998), el *The Blue Mountains Eye Study*, en el cual se relacionan las opacidades corticales con glucemias altas y las subcapsulares posteriores con diabetes de reciente comienzo (Saxena, Mitchell et al. 2004), y en *The Barbados Eye Study*,

relacionan las cataratas corticales y subcapsulares posteriores con niveles aumentados de hemoglobina glicosilada (Hennis, Wu et al. 2004).

La **hipertensión arterial**; tanto la sistólica (Kahn, Leibowitz et al. 1977) como la diastólica (Clayton, Cuthbert et al. 1980), incluso puede tener que ver con el tratamiento antihipertensivo (Cumming and Mitchell 1998), aunque realmente se desconoce el mecanismo.

El **tabaco**; por disminución de antioxidantes endógenos (Cheng, Pang et al. 2000) y por daño directo al acumular metales pesados como cadmio, plomo y cobre (Cekic 1998). Se ha relacionado la opacidad nuclear y subcapsular posterior con el tabaco (DeBlack 2003) y parece que la relación es dosis- dependiente (West, Munoz et al. 1989), así en *The Physicians Health Study* se observa que al dejar de fumar disminuye el riesgo, por lo que se considera cierta reversibilidad en su efecto (Christen, Glynn et al. 2000).

El **alcohol y factores nutricionales** (2001); (Mukesh, Le et al. 2006), la oxidación es considerada cataratógena, y en el ojo existen estructuras con estas propiedades de forma natural que protegen al ojo frente a agresiones (Trevithick and Mitton 2000), además en la dieta existen gran cantidad de agentes con propiedades antioxidantes, el problema en

cuanto al estudio de estos agentes es que es muy complicado establecer cuales influyen y cuáles no en el desarrollo y en la prevención de las cataratas, así por ejemplo en *The Lens Opacities Case-Control Study*, se encontró que la vitamina C en la dieta protegía frente a la catarata (Leske, Chylack et al. 1991) sin embargo en *The Longitudinal Cataract Study* no se encontró esta relación (Leske, Chylack et al. 1998), aunque en la mayoría de los estudios se encuentran contradicciones sí parece que el efecto de dietas polivitamínicas es protector frente a cataratas en pacientes con dietas pobres en vitaminas (Abraham, Condon et al. 2006).

La **exposición a radiación U.V. y calor local**: por disminución de los antioxidantes locales (Fris, Cejkova et al. 2008), en el caso de la exposición a U.V. el daño se produce en la cortical anterior porque es la que más energía radiante recibe y sobre todo en el cuadrante nasal inferior (Sasaki, Kawakami et al. 2003), por eso no influye en la opacidad nuclear ni subcapsular posterior (West, Duncan et al. 1998).

La **miopía**: parece debido a que los miopes asocian otras patologías oculares (Saw, Gazzard et al. 2005) y así se relaciona con la opacidad nuclear; ésta por sí misma puede aumentar la miopía. En *The Visual Impairment Project*, relacionan la miopía con todos los tipos de catarata (McCarty, Mukesh et al. 1999) pero en una revisión hecha en 2006 sólo se

relacionó con la cortical (Mukesh, Le et al. 2006). En *The Beaver Dam Eye Study* se encontró relación con la opacidad nuclear (Wong, Klein et al. 2001), en *The Blue Mountains Eye Study* la relación se estableció en pacientes con altas miopías con la opacidad nuclear, y en media y alta miopía con la subcapsular posterior (Panchapakesan, Rochtchina et al. 2003), en *The Barbados Eye Study*, bajas miopías se relacionan con cataratas nucleares (Leske, Wu et al. 2002). El mecanismo por el que la miopía produce catarata es desconocido aunque se especula que tenga que ver con la peroxidación lipídica (Saw, Gazzard et al. 2005).

El **peso y el consumo de grasas**: Relacionarlo de forma individual con la catarata es difícil pero en distintos estudios como *The Nurses' Health Study* (Jacques, Moeller et al. 2003), *the Physicians Health Study* (Glynn, Christen et al. 1995), el *estudio Framingham* (Hiller, Podgor et al. 1998) y *the Beaver Dam Eye Study* (Klein, Klein et al. 1998), hablan de la relación entre el índice de masa corporal y la opacidad subcapsular posterior, se desconoce la relación entre el índice de masa corporal y la catarata, aunque en *the Nurses' Health Study* se relaciona con la consumición de ácidos grasos sobretodo linoleico y linolénico (Lu, Taylor et al. 2005), parece que debido al efecto citotóxico que tienen sobre las células del epitelio; en un estudio posterior sobre la misma cohorte se vió que la toma de ácidos grasos omega-3 protegía frente a catarata (Lu, Cho et al. 2005).

Los **corticosteroides**: desde los años 60 se habla de la relación entre los corticoides orales y la catarata (Carnahan and Goldstein 2000) sobre todo la subcapsular posterior , la importancia de los mismos se debe a que son la base de los tratamientos de enfermedades inmunológicas, como antiinflamatorios y que está en relación tanto con la dosis como con el tiempo de duración del tratamiento (Urban and Cotlier 1986); respecto a los corticoides inhalados la relación no es tan clara, hay estudios que concluyen que no existe dicha relación (Simons, Persaud et al. 1993), otros como en *The Blue Mountains Eye Study* sin embargo encuentran una clara relación tanto con la opacidad nuclear como con la subcapsular posterior (Cumming, Mitchell et al. 1997) y otros concluyen que existe relación en pacientes mayores de 40 años (Jick, Vasilakis-Scaramozza et al. 2001).

En cualquier caso parece existir una variabilidad individual y sinergismo con otros factores cataratogénicos (Urban and Cotlier 1986).

La **terapia hormonal sustitutiva**: La catarata parece ser más frecuente en mujeres (Sperduto and Hiller 1984); (Klein, Klein et al. 1992); (Mitchell, Cumming et al. 1997); (Cheng, Liu et al. 2000); (Leske, Wu et al. 2000); debido probablemente al descenso de estrógenos tras la menopausia; se llegó a esta conclusión porque parece existir un efecto protector frente a catarata en mujeres postmenopáusicas tratadas con terapia hormonal

sustitutiva, aunque los resultados son contradictorios, así en *the Beaver Dam Eye Study* se encontró esta relación protectora en un principio (Klein, Klein et al. 1994), pero posteriormente y en la misma población no se encontró dicha relación (Klein, Klein et al. 2003); en *the Blue Mountains Eye Study* también se observó esta relación protectora (Younan, Mitchell et al. 2002), sin embargo en *The Visual Impairment Project* no se observó (Mukesh, Le et al. 2006).

La **herencia**: de interés cada vez mayor, ya que encontrar genes relacionados con la cataratogénesis abrirían nuevas vías de intervención; existe una gran heterogeneidad genética (Robman and Taylor 2005), y en general en los pacientes que las padecen, es raro encontrar mutaciones en los genes que codifican las cristalinas- α no así en los que codifican las cristalinas β y γ .

Se han realizado diversos estudios como el *Framingham* en el cual se encontró un aumento de la frecuencia de catarata entre hermanos que la padecían, creyéndose debido a algún factor genético, aunque también a factores ambientales (1994), en *The Beaver Dam Eye Study* se especula con la influencia de la herencia mendeliana (Heiba, Elston et al. 1993), en un estudio realizado en gemelos, que relaciona la influencia genética con los factores ambientales, concluye que la herencia mendeliana (Autosómica

Recesiva) justifica hasta casi un 50% de los casos de catarata relacionada con la edad: la más frecuente es la nuclear que está producida en un 48% por herencia, en un 38% es consecuencia directa de la edad, y en un 14% es debido a factores ambientales (Hammond, Snieder et al. 2000). En otro estudio realizado en población japonesa se observó que pacientes con una delección en el gen de la glutatión-s-transferasa presentaban catarata a una edad mucho menor que los que no presentaban esa delección (Sekine, Hommura et al. 1995), se intentó repetir en población italiana pero no se encontró esta relación entre la delección y la catarata (Alberti, Oguni et al. 1996), por otro lado la deficiencia de galactokinasa produce hipergalactosemia y catarata precoz y la mutación responsable de ello en recién nacidos se ha identificado en catarata senil en japoneses (Okano, Asada et al. 2001), sin embargo la misma asociación se buscó en población italiana y tampoco se encontró (Maraini, Hejtmancik et al. 2003).

1.6. GENÉTICA DE LA CATARATA SENIL

En la población general existen gran cantidad de polimorfismos, definidos como mutaciones que se repiten más del 1% y que son cambios de una base nitrogenada por otra; por repetirse tanto, no producen

enfermedad sino que son responsables de la variabilidad en la especie. En este trabajo hemos considerado algunos de ellos como son: *Glutathion*, el cual tiene una potente actividad antioxidante que evita el desarrollo de catarata (Spector 1984), *Metileno-Tetrahidro-Folato-Reductasa*, ya que ciertos polimorfismos producen hiperhomocisteinemia, que puede disminuir con suplementos orales de folato en la dieta, y se ha demostrado un papel protector del folato frente a catarata (Taylor, Jacques et al. 2002); (Kuzniarz, Mitchell et al. 2001), y *Óxido Nítrico*, bien directamente o indirectamente a través de sus metabolitos, debido al papel que tienen en el estrés oxidativo (Ornek, Karel et al. 2003); (Varma and Hegde 2007) y su relación con el desarrollo de catarata en edades avanzadas.

El estrés oxidativo se define como la situación en la que existe un desequilibrio entre factores oxidantes y antioxidantes.

La edad parece ser, con mucho el mayor factor de riesgo para desarrollar catarata y la oxidación parece la responsable de los cambios que se producen en el cristalino con catarata, no así en el cristalino senil (no siempre acompañado de catarata). En el cristalino uno de los principales antioxidantes acuosos es el glutathion (GSH) el cual, es un tripéptido (L-glutamil-L-cisteinil-glicina) con gran potencia antioxidante. Se denomina sistema GSH al conjunto formado por éste y los enzimas relacionados con

su metabolismo, responsables del mantenimiento de su estado de óxido-reducción en condiciones fisiológicas (Meister 1988). Los niveles de GSH en el cristalino son varias veces superiores a las concentraciones plasmáticas y van disminuyendo con el transcurso de los años (Reddy and Giblin 1984).

Otro ejemplo de potente antioxidante es la vitamina E, experimentalmente, no se halló una relación entre la ingesta de vitamina E y su concentración en el cristalino; sin embargo, la suplementación con vitamina E produjo disminución de la incidencia de cataratas en animales expuestos a factores cataratogénicos (Ohta, Yamasaki et al. 2000).

Parece que la disminución de GSH (probablemente debida a oxidación) de la zona nuclear es el punto crucial en la formación de la catarata nuclear (Reddy and Giblin 1984); (Giblin 2000), es curioso que mientras los niveles de GSH a nivel nuclear disminuyen, a nivel cortical se mantienen, incluso aumentan (Truscott and Augusteyn 1977).

Por otro lado, los radicales libres son moléculas en la cual uno de sus átomos presenta un electrón desapareado; tienen actividad como agentes oxidantes produciendo alteración de macromoléculas bien por reacción directa con ellas o por la interacción de estos radicales con el

oxígeno y entre ellos tenemos: radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, anión superóxido (Chance, Sies et al. 1979).

La concentración de GSH es crucial porque determina la dirección del proceso de oxidación; se han realizado experimentos mezclando GSH con Hierro y con Hipoxantina y Xantina Oxidasa (Halliwell 1989):

-GSH > 1mM. Inhibe la formación de radicales hidroxilo.

-GSH < 1mM. Estimula su formación.

El Oxígeno también se ha estudiado al observar un aumento de cataratas en gente tratada con oxígeno hiperbárico, parece que al aumentar su concentración produce un aumento del H₂O₂ (Borchman, Giblin et al. 2000).

En cada zona del cristalino las concentraciones de oxígeno son distintas y es la mitocondria la encargada de mantener bajas concentraciones de oxígeno, con los años, se altera la función mitocondrial, y aumenta el oxígeno en el cristalino (McNulty, Wang et al. 2004) .

La edad en el cristalino condiciona cambios, como alteración de las propiedades elásticas de la membrana (Glasser and Campbell 1998),

aumento de su contenido en colesterol, aumento de la fluorescencia (Lerman 1991), disminución del poder refractivo. Con la edad se impide el paso de antioxidantes al interior del núcleo y ello predispone a la oxidación del mismo (Sweeney and Truscott 1998); esta barrera entre núcleo y cortex hace que las moléculas inestables que deberían atravesar la barrera, consuman mucho más tiempo en el núcleo y por tanto estén más tiempo descomponiéndose.

Los niveles de GSH disminuyen después de alcanzar una edad media en el núcleo (Dickerson and Lou 1997) probablemente por el efecto de la barrera. Por esta teoría de la barrera tiene más sentido la formación de una catarata nuclear, antes se hablaba de que los radicales libres aumentaban en el humor acuoso, pero esto produciría catarata cortical y no nuclear.

Los GSTs son una familia de numerosos genes cuyos productos enzimáticos catalizan la conjugación de intermediarios químicos reactivos a glutatión, un compuesto soluble, para facilitar su aclaramiento. La mayoría de las GSTs son enzimas diméricas solubles (Zhong, Howie et al. 1991).

Hasta ahora se han identificado cuatro clases de GSTs denominados alpha, mu, pi y theta (Zhong, Howie et al. 1991) dependiendo de la secuencia de aminoácidos.

Las diferencias hereditarias en la actividad enzimática de los GST son debidas a polimorfismos genéticos.

La clase theta de GSTs comprende dos genes que codifican dos proteínas GSTT1 y GSTT2. El gen de la GSTT1 se encuentra en el cromosoma 22q11.23, consta de 5 exones y 4 intrones que ocupan 8.09 Kb y codifica una proteína de 27.1 KDa. La secuencia de cDNA de GSTT1 contiene 1002 pb y comprende la secuencia codificante de 720 pb, que incluye un residuo inicial de metionina, y una secuencia final no codificante de 282 pb localizada en posición 3'. Se produce una proteína de 239 aa que tiene la misma longitud que la subunidad 5 del enzima GST en ratas y es mayor que otras enzimas pertenecientes al grupo de las GSTs.

El gen GSTT1 está implicado en la conjugación de sustancias químicas utilizadas en la industria como diclorometano y óxido de etileno. Aproximadamente el 60-70% de la población humana es capaz de llevar a cabo esta reacción metabólica, “conjugadores”, mientras que el resto, son

incapaces de realizarlo, “no conjugadores”, al haber heredado dos alelos nulos para el gen GSTT1.

Este genotipo homocigoto nulo se asocia a un incremento en el daño al DNA por carcinógenos experimentales (Wiencke, Pemble et al. 1995)

Sin embargo, el status de conjugador positivo no es necesariamente beneficioso, porque mientras la conjugación de monohalometanos y óxido de etileno es detoxificante, la conjugación de diclorometano produce un metabolito mutagénico. Dado que los monohalometanos, óxido de etileno, diclorometano y otros hálidos alquilos tienen un amplio uso industrial como agentes alquilantes, fumigantes para tierra, pesticidas y disolventes, cualquier locus polimórfico que pueda estar implicado en su metabolismo, tendría un interés epidemiológico.

El gen GSTM1 pertenece a la familia de GSTs de clase mu que se localiza en el cromosoma 1p13 y que contienen al menos 5 genes codificando las subunidades GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 Y GSTM5 (Mattey, Nixon et al. 1993). Consta de 8 exones y 7 intrones que ocupan 5.92Kb y codifica una proteína de 25.6 KD, o lo que es lo mismo, traduce una proteína de 217 aa. GSTM1 carece de actividad enzimática en

aproximadamente el 40-50% de la población caucásica (Hirvonen, Husgafvel-Pursiainen et al. 1993); (Ambrosone, Freudenheim et al. 1995). La ausencia de actividad GSTM1 está causada por heredar dos alelos que tienen una delección del gen y no expresan proteína.

Los genes GSTM codifican enzimas que catalizan la detoxificación de sustancias electrófilas, incluyendo epóxidos. También son substratos ciertos productos que reaccionan con el oxígeno atacando al DNA, sugiriendo que estas isoformas tienen un papel en la reparación del DNA (Ketterer, Fraser et al. 1990).

La GSTM1 está implicada fundamentalmente en la metabolización de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Éstos están presentes en el humo del tabaco y entornos urbanos y son carcinógenos humanos.

A nivel general se ha encontrado relación entre la HTA resistente a tratamientos convencionales y la GSTM1 (Cruz-González, González-Sarmiento et al. 2009).

Oftalmológicamente los polimorfismos genéticos que afectan a la GSTT1 y a la GSTM1 se han relacionado con el glaucoma primario de ángulo abierto (Juronen, Tasa et al. 2000), con la catarata cortical (Juronen,

Tasa et al. 2000), y con los demás tipos de catarata (Guven, Unal et al. 2007).

El folato es una molécula compleja formada por ácido pterico y entre uno y nueve residuos de ácido glutámico (figura 4).

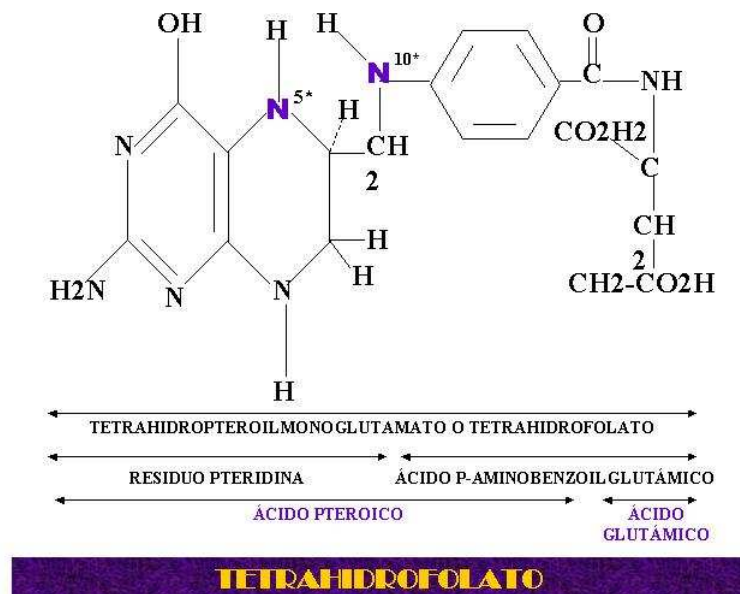


Figura 4: Estructura molecular del Folato

El folato de los alimentos aparece principalmente como 5-metiltetrahidrofolato y como formiltetrahidrofolato (Stokstad and Koch 1967); (Butterworth, Santini et al. 1963).

El papel metabólico del folato consiste en transportar unidades monocarbonadas que aparecen en distintos niveles de oxidación. La fuente principal de unidades monocarbonadas en el metabolismo del folato es el carbono β de la serina, en una reacción catalizada por la serina hidroximetiltransferasa en la que se genera glicina y el tetrahydrofolato (figura 5) se convierte en 5,10-metiléntetrahydrofolato.

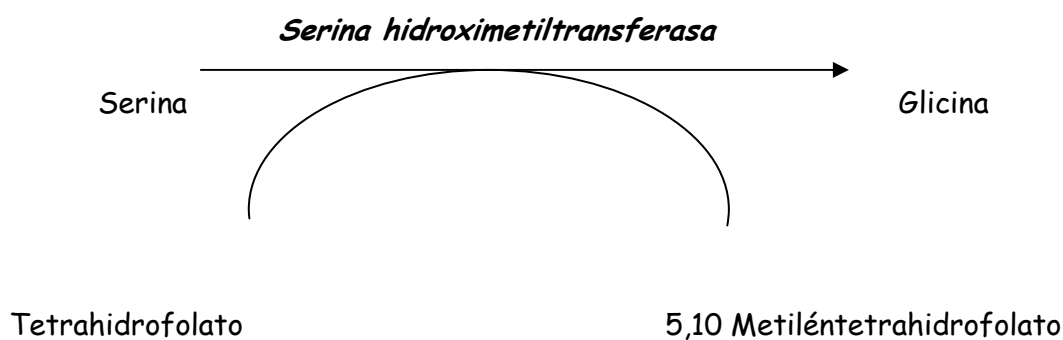


Fig.5: Síntesis del 5,10-metiléntetrahydrofolato.

Las dos rutas más importantes en el metabolismo relacionado con el folato (figura 6) son las siguientes:

A) biosíntesis de purinas y pirimidinas:

B) ciclo de remetilación de la homocisteína: biosíntesis de novo de metionina dependiente de folato.

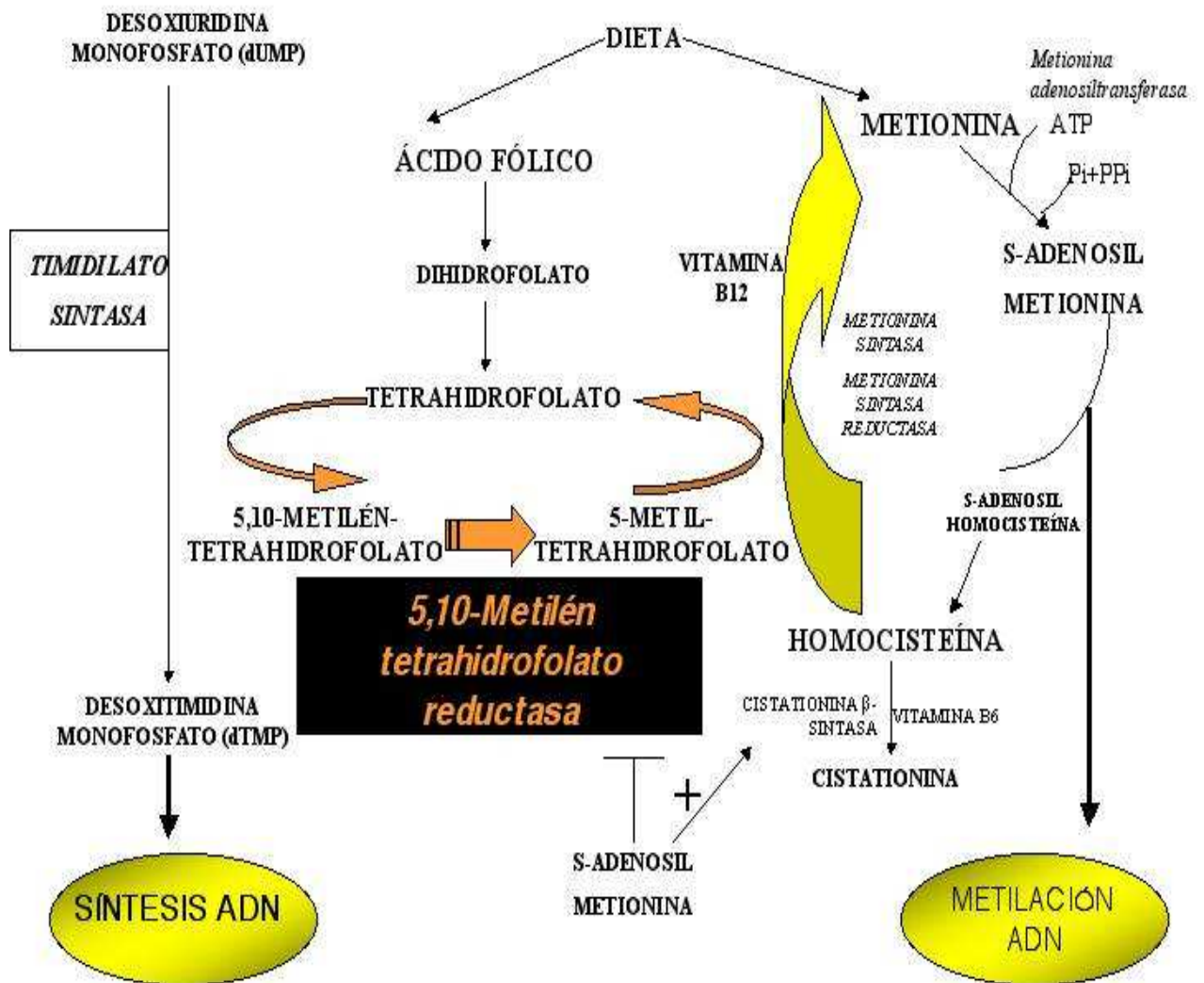


Fig. 6: Visión general del metabolismo del folato

La clonación del gen MTHFR permitió la identificación de mutaciones asociadas con distintos grados de deficiencia en 5,10-MTHFR. Estas investigaciones arrojaron nueva luz sobre el fondo genético, explicando la heterogenicidad de los fenotipos clínicos.

El gen MTHFR humano está localizado en el cromosoma 1p36.3 (Goyette, Sumner et al. 1994). La región codificante tiene un tamaño de 1980 pb (Goyette, Sumner et al. 1994). El gen MTHFR consta de 11 exones con tamaños desde 102 hasta 432 pb. El tamaño de los intrones oscila entre las 250 y las 1500 pb, a excepción de un intrón de 4200 pb.

La enzima 5,10 metiléntetrahidrofolato reductasa (5,10-MTHFR) es una flavoproteína que consta de dos subunidades idénticas de aproximadamente 74.5 KDa cada una (Daubner and Matthews 1982), que traduce una proteína de 656 aa. La región catalítica N-terminal de la proteína contiene un sitio de unión para flavín-adenín dinucleótido (FADH), otro para nicotín-adenín dinucleótido fosfato (NADPH) y un tercero para el 5,10 metiléntetrahidrofolato.

La región carboxilo terminal interviene en la regulación de la enzima ya que tiene un sitio de unión para su inhibidor, la S-adenosilmetionina (SAM). Las dos regiones nombradas están unidas por una zona central extremadamente hidrofílica (Fodinger, Buchmayer et al. 2000).

Se han descrito 26 variaciones nucleotídicas en el gen MTHFR la mayoría de las cuales dan lugar a una menor actividad de la enzima 5,10-

MTHFR. Además, se han caracterizado dos mutaciones en zonas de procesamiento del RNA, así como una inserción-delección (Yano, Nakaso et al. 2004).

Dentro de estas variaciones se han descrito dos polimorfismos de mayor importancia. Uno de ellos está localizado en el exón 4, más concretamente en la región que codifica la unión del folato, y consiste en un cambio de citosina (C) por timina (T) en el nucleótido 677 del gen, lo que se traduce en un cambio de alanina por valina en la secuencia aminoacídica de la proteína. Los individuos homocigotos para esta variante muestran una enzima 5,10-MTHFR termolábil cuya actividad enzimática es aproximadamente un 35% de la que presentan los individuos sin mutación, y que conlleva una disminución en la síntesis de 5-metiltetrahydrofolato (Frosst, Blom et al. 1995); (Ueland, Nygard et al. 2001). Además, los portadores de dos alelos valina muestran una distribución anormal de los folatos en los eritrocitos, con una mayor concentración de formiltetrahydrofolato poliglutamato (Bagley and Selhub 1998).

El genotipo 677TT está asociado con unos niveles plasmáticos de homocisteína significativamente más altos que los de individuos heterocigotos (677CT) u homocigotos 677CC (Frosst, Blom et al. 1995); (Guttormsen et al. 1996) observaron que la mayoría de individuos con

hiperhomocisteinemia mayor de 40 $\mu\text{mol/l}$ en la población general, son portadores del alelo T y tienen niveles bajos de folato. El folato estabiliza la enzima termolábil con la mutación C677T (Frosst, Blom et al. 1995); (Bailey 2003). Niveles de folato mayores de 15,4 nM parece neutralizar los efectos de la mutación C677T (Jacques, Bostom et al. 1996).

El polimorfismo C677T presenta una frecuencia relativamente alta: el genotipo 677TT aparece en el 12% de la población general aproximadamente, y muestra una distribución muy heterogénea entre los distintos grupos étnicos (Rosenberg, Murata et al. 2002).

En Europa la frecuencia global del alelo mutado es de 0,32 aproximadamente (Gudnason, Stansbie et al. 1998). La presencia del alelo mutado estaba en dicho estudio asociada con niveles altos de homocisteína plasmática total (16,5 $\mu\text{mol/l}$) en comparación con los heterocigotos (10,4 $\mu\text{mol/l}$) u homocigotos silvestres (10 $\mu\text{mol/l}$). Este aumento de la homocisteína se ha comprobado en todos los países y regiones de Europa, pero es significativamente mayor en el sur de Europa. Esta diferencia geográfica en los niveles de homocisteína podría deberse a otros factores genéticos o a factores ambientales (Gudnason, Stansbie et al. 1998); (Gasparovic, Raslova et al. 2004).

La alta frecuencia con que aparece este polimorfismo en la población general sugiere que en el pasado esta mutación confería una ventaja selectiva. En tiempos de hambruna, la menor actividad de la 5,10-MTHFR llevaba a una menor remetilación de la homocisteína y así conservaba las unidades monocarbonadas disponibles en el metabolismo del folato para la síntesis de purinas y timidina (Blom 1998). Otra hipótesis es el menor riesgo de padecer ciertas enfermedades en los individuos que heredaban esta mutación (Engbersen, Franken et al. 1995).

Un segundo polimorfismo relevante consiste en un cambio de adenina por citosina en el nucleótido 1298 del gen 5,10-MTHFR, dentro del exón 7, en la región que codifica el dominio regulador de la proteína (van der Put, Gabreels et al. 1998); (Weisberg, Tran et al. 1998). Este cambio de base da lugar a un cambio de glutamina por alanina en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5,10-MTHFR. Dicho cambio reduce la actividad de la enzima hasta en un 60% en homocigotos 1298CC respecto a los valores control (van der Put, Gabreels et al. 1998); (Weisberg, Tran et al. 1998). Esta mutación parece afectar a la regulación de la enzima a través de su inhibidor S-adenosilmetionina. En contraste con el polimorfismo C677T, los heterocigotos y homocigotos para el polimorfismo A1298C no se relacionan ni con mayor nivel de homocisteína plasmática ni menor folato plasmático. Sin embargo, los heterocigotos para

los dos polimorfismos muestran una actividad enzimática de 5,10-MTHFR reducida (50-60% de los valores control) y una concentración mayor de homocisteína y folato en el plasma, al igual que los individuos homocigotos 677TT (Van der Put, Gabreels et al. 1998).

La presencia de estos polimorfismos se ha relacionado con distintas enfermedades vasculares (Frosst, Blom et al. 1995); (Engbersen, Franken et al. 1995); (Hefler, Jirecek et al. 2004), defectos en el tubo neural (Van der Put et al., 1995); (Botto et al., 2000), complicaciones durante el embarazo (Kupferminc, Eldor et al. 1999); (Murakami, Matsubara et al. 2001), y otras enfermedades de índole variada (Mills, Kirke et al. 1999); (Bailey and Gregory 1999).

El genotipo con los cuatro alelos poco frecuentes (677TT / 1298CC) se considera incompatible con la vida debido a los problemas que ocasiona en el embarazo, en el desarrollo del tubo neural en embriones, y en la metilación del DNA (Isotalo, Wells et al. 2000). Asimismo, según algunos autores el genotipo 677CT / 1298CC también disminuye la viabilidad de los fetos en desarrollo (Isotalo, Wells et al. 2000), aunque otros estudios afirman que no provoca una desventaja selectiva significativa (Gerhard, Nguyen et al. 2003); (Volcik, Blanton et al. 2001).

Se ha postulado un papel protector del polimorfismo C677T en relación con el aumento de la disponibilidad de 5,10-metiléntetrahidrofolato, lo cual facilitaría la síntesis de nucleótidos. También podría deberse al aumento de otros tipos de folato en las células (Bagley and Selhub 1998). Diversos estudios coinciden en afirmar que el genotipo 677TT en individuos con niveles altos de folato disminuye el riesgo de adenoma y cáncer de colon (Benito, Cabeza et al. 1993); (Freudenheim, Graham et al. 1991); (Slattery, Berry et al. 1997).

Por el contrario, la variante C677T podría tener un efecto deletéreo al comprometer la metilación del DNA (Friso, Choi et al. 2002); (Paz, Avila et al. 2002). Hay evidencias de que la alteración en los patrones de metilación del DNA favorece la oncogénesis: en distintos tipos de cáncer aparece una hipometilación del DNA (colon, estómago, cuello del útero, próstata, tiroides y mama) (Kim 1999). La hipometilación es más dañina cuando ocurre en zonas específicas que a nivel genómico, y parece favorecer la aparición de mutaciones: la 5-metilcitosina es más inestable que la citosina, y fácilmente puede desaminarse convirtiéndose en una transición C-T. Paradójicamente, la citosina también puede desaminarse para convertirse en uracilo cuando los niveles SAM disminuyen (Shen, Rideout et al. 1992). Por otra parte, la deficiencia en folato induce roturas cromosómicas por la presencia de uracilo en el DNA al disminuir la síntesis

de timidilato: el mecanismo de reparación de estas incorporaciones erróneas pasa por una rotura en la hebra sencilla que puede llevar a rotura de la doble cadena aumentando la inestabilidad genética (Branda and Blickensderfer 1993); (Blount, Mack et al. 1997); (Heijmans, Boer et al. 2003).

Varios estudios han identificado el folato como factor protector frente a catarata nuclear, cortical y subcapsular posterior (Zetterberg, Tasa et al. 2005). El ácido fólico que aportamos en la dieta, es transformado por la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en 5-metiltetrahidrofolato; este es el encargado de transformar la homocisteína en metionina. El MTHFR 677C-T y 1298A-C son polimorfismos genéticos frecuentes que hacen disminuir la actividad de la enzima y producen homocistinemia la cual en el ojo produce, alteraciones patológicas como oclusiones vasculares, glaucoma de ángulo abierto, neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica (Pianka, Almog et al. 2000); (Bleich, Junemann et al. 2002).

Parece que el efecto protector del folato en la dieta frente a catarata no lo es frente a hiperhomocisteinemia asociada a estos polimorfismos. La relación de la MTHFR 677CC/1298AA está claramente representada en pacientes con catarata, tienen aumentada la actividad de la MTHFR, y

suplementos del folato en la dieta protegerán frente a ella (Zetterberg, Tasa et al. 2005).

El óxido nítrico (NO) es un gas presente en la atmósfera que por contener un electrón no apareado se considera un radical libre que es muy lipofílico y difunde a través de las membranas celulares. Es una molécula que desempeña múltiples funciones en procesos fisiológicos como la comunicación interneuronal (Rothe, Possel et al. 2002); (von Bohlen und Halbach 2003) o la regulación del tono vascular (Boulanger 1995) . Además, actúa como un neurotransmisor excitador en la comunicación entre el sistema nervioso y la musculatura vascular. El aumento de su producción y liberación en las terminaciones presinápticas intraespinales contribuye a la sensibilización de las neuronas espinales y a la hiperalgesia.

El NO se sintetiza a partir de L-arginina por acción de la sintasa del óxido nítrico (NOS) (Obata 2006); (Mathers, Brandt et al. 2009). La activación de la NOS potencia la nocicepción, mientras que su inhibición disminuye la hiperalgesia en los procesos inflamatorios. Aunque algunos estudios sugieren que el NO podría participar en procesos inhibidores de la nocicepción, el hecho de que el NO aumente la sensibilidad de los nociceptores periféricos hace de él un candidato para desempeñar un papel importante en la fisiopatología del dolor (Schmidtko, Tegeder et al. 2009).

Tiene un papel clave en la vasodilatación, la inmunidad, la inflamación y la neurotoxicidad: en estas situaciones se expresa la isoforma de la oxidonitrico sintasa (NOS). Las isoformas generan gran cantidad de NO que es el responsable de las acciones citotóxicas y citostáticas (Obata 2002); (Chatterjee and Catravas 2008).

El NO puede tener toxicidad directa o a través de otros radicales libres en los cuales se convierte (figura 7) como el peroxinitrito (Cuzzocrea, Zingarelli et al. 1997). La toxicidad de todos estos radicales libres se debe a la alteración que producen en las proteínas, en las cuales se forman grupos carbonilos y oxidan los grupos sulfidrilos; esto lleva a que disminuya la actividad del ATP e inhiba a la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP-asa (Seven, Turkozkan et al. 2005); (Obata 2006) responsable del transporte activo (Varma, Hegde et al. 2003), que a nivel celular produce aberraciones y las células pierden sus núcleos y sus organelas.

En el núcleo cristalino se produce una migración posterior de células epiteliales de la zona ecuatorial a la zona subcapsular, en vez de la esperada, de la zona cortical a la nuclear (Hegde, Henein et al. 2003).

El NO tiene una vida media corta, así que estudiamos su metabolito: el nitrito (Cuzzocrea, Zingarelli et al. 1997); el cual es

determinado por espectrofotometría, al exponerlo a la luz, genera NO y radicales OH (implicados en reacciones de oxidación); el NO se puede reoxidar y volver a pasar a nitrito con lo cual se convierte en un circuito cerrado que genera NO (Bauer and Fung 1994). Por esta razón parece que la exposición a la luz contribuye a la formación de cataratas.

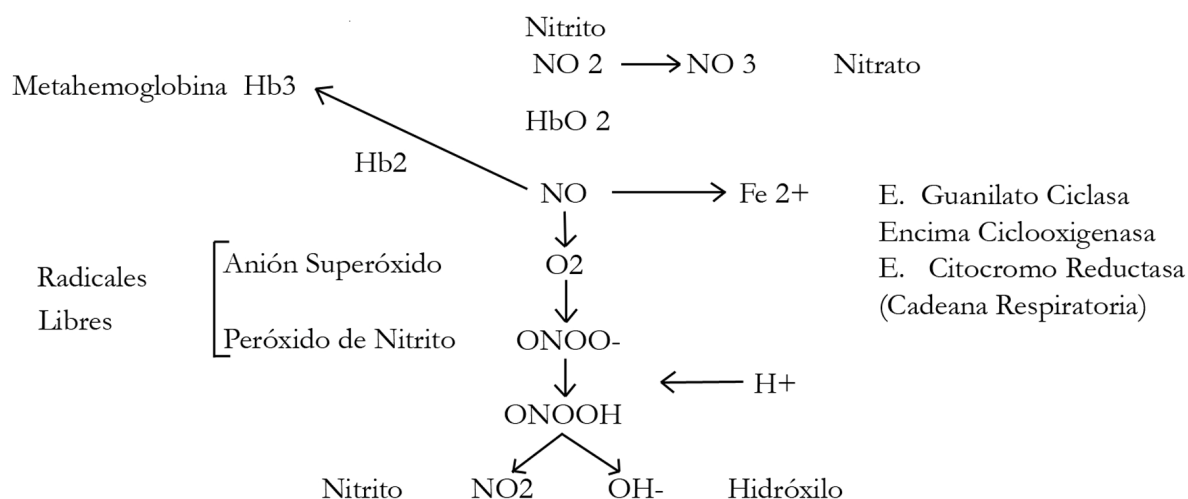


Figura 7: Características químicas del óxido nítrico

Se ha demostrado que el nitrito produce las mismas alteraciones en el cristalino que las observadas en la catarata senil.

Se ha observado que el nitrito es más alto en cristalino con cataratas que en cristalinos transparentes (Hao, Ling et al. 2004) y aunque la

diferencia no es estadísticamente significativa sí que existe una marcada diferencia (Ito, Nabekura et al. 2001).

Además en ojos en los que se había visto un aumento de nitrito y un aumento de catarata, se observa un efecto protector de la aminoguanidina, inhibidor del NO (Sorrells, Friend et al. 1996); (Inomata, Hayashi et al. 2000).

En condiciones patológicas como inflamación, isquemia, etc. se observa un aumento de actividad de la óxido nítrico-sintasa, con lo cual aumenta la producción de NO y por tanto de nitrito, peroxinitrito y otros radicales libres (Schulz, Jansen et al. 2008), esta pudiera ser una de las razones por las que en situaciones como DM e HTA aumenta la incidencia de catarata (Jurowski, Gos et al. 2002); (Kao, Chou et al. 2002).

Existen muchos estudios que relacionan la DM y el NO, la HTA y el NO pero existen pocos que relacionen catarata y NO (Varma and Hegde 2007).

Dentro del globo ocular, en condiciones normales el NO es producido por el endotelio vascular, coroideo y se encuentra en el humor acuoso; aunque realmente en situaciones como la DM y la HTA existen

alteraciones de la microvasculatura y por tanto debería existir una disminución de nitritos, sin embargo el efecto es el contrario, aumentando los mismos, lo que sugiere que debe haber una alteración general que produce aumento del NO (Hattenbach, Allers et al. 2000); (Yilmaz, Acar et al. 2000).

Se han descrito hasta el momento tres isoformas de la proteína NOS: la NOS endotelial (eNOS o NOS3); la NOS inducible (iNOS o NOS2) y la NOS neuronal (nNOS o NOS1) (Chatterjee and Catravas 2008). La eNOS y la nNOS son las isoformas constitutivas y su activación es dependiente de calcio (Hoyt, Tang et al. 1992); (Mize and Lo 2000), mientras que la iNOS es independiente de los niveles de calcio y se sintetiza como respuesta a la activación de la reacción inmune (Kuchan and Frangos 1994). Las alteraciones en la expresión o en la actividad de las enzimas NOS influyen directamente en la producción de NO.

El gen que codifica la eNOS humana (NOS3) se localiza en el cromosoma 7q35-36 (Arngrimsson, Hayward et al. 1997). Este gen consta de 26 exones y 25 intrones que ocupan 20,78Kb y se transcriben en un mRNA de 3690pb que codifica una proteína de 133,2kD. o lo que es lo mismo de 1202 aa. Desde su caracterización en 1990 se han identificado varios polimorfismos (Hingorani 2003) entre los que destacan, por ser los

más frecuentes, el -786T>C de la región promotora del gen, cambio de timina por citosina en la posición -786, o lo que es lo mismo, cambio de valina por alanina en esa posición y el G894T, cambio de guanina por timina en posición 894, o lo que es lo mismo, cambio de glutámico por aspártico en posición 298, localizado en el exón 7 (Luizon, Izidoro-Toledo et al. 2009); (Cruz-González, González-Sarmiento et al. 2009).

Así, existen muy diversas manifestaciones de estos polimorfismos, como ejemplo:

-Mayor susceptibilidad de padecer alteraciones en la presión arterial (Pacanowski, Zineh et al. 2009) en personas con el polimorfismo -786T>C así como mayor probabilidad de padecer HTA esencial (Nejatizadeh, Kumar et al. 2008) e HTA resistente a tratamientos convencionales (Cruz-González, Gonzalez- Sarmiento et al. 2009).

-En pacientes diagnosticados de cáncer de próstata y mediante estímulo angiogénico el -786T>C induce la progresión del mismo, tanto por daño directo de las células como del DNA (Marangoni, Araujo et al. 2008).

-El polimorfismo -786T>C se relaciona con abortos de repetición (Zammiti, Mtiraoui et al. 2008) con disminución en la producción de NO.

-El polimorfismo Glu298Asp se considera factor de riesgo para preeclampsia (Serrano, Casas et al. 2004).

-En pacientes con problemas coronarios, el poseer las variantes 298Asp, y el -786C, del gen eNos son factores de riesgo para reestenosis de stent coronarios (Gomma, Elrayess et al. 2002)

-La mutación -786T>C está asociada a una resistencia a la insulina tanto en diabéticos como en no diabéticos Japoneses (Ohtoshi, Yamasaki et al. 2002).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El envejecimiento de la población ha provocado un aumento de la prevalencia de las cataratas. Las cataratas seniles son responsables de prácticamente la mitad de las cegueras existentes en el mundo (Allen 2008) y el único tratamiento existente en la actualidad es el quirúrgico.

La herencia predispone al desarrollo de ciertas enfermedades; en la actualidad, con la descripción del genoma y con la gran cantidad de desarrollos técnicos existentes se abren nuevas expectativas e interés por el conocimiento genético. También existen factores de riesgo externos que sabemos predisponen a desarrollar catarata, los cuales se dividen en factores demográficos, de ambiente, de estilo de vida, de enfermedades relacionadas, etc. La observación de que en determinadas familias existe una mayor agrupación de pacientes con cataratas, junto con los estudios realizados en gemelos, sugieren que, junto con factores ambientales, existen factores genéticos que favorecen el desarrollo de cataratas.

La verificación de algún tipo de polimorfismo genético en pacientes con catarata senil podría relacionar dicha patología con factores de riesgo cuya predisposición genética sería determinante para el desarrollo de opacificación cristalina.

Para la comprobación de esta hipótesis proponemos los siguientes objetivos:

-Recopilar una muestra de pacientes de la población lo más representativa posible, discriminando mediante pruebas clínicas objetivas los que tienen catarata de los que no la tienen.

-Describir en nuestra cohorte de pacientes los factores de riesgo que presentan: diabetes mellitus, hipertensión arterial, hábito tabáquico, hábito alcohólico, exposición a ultravioleta y a calor local.

-Analizar y descartar ciertos polimorfismos como causa de catarata, como se ha comentado en la introducción hemos elegido tres genes que se había visto tenían algún tipo de relación con la génesis de la misma, y estos son los siguientes:

-El gen de la Glutation Transferasa: GSTT1 y GSTM1.

-En el gen de la 5,10MTHFR: el C677T (cambio de citosina por timina en el nucleótido 677) y el A1298C (cambio de adenina por citosina en el nucleótido 1298).

-El gen eNos: el -786T>C (cambio de timina por citosina en el nucleótido -786) y el G894T (cambio de Guanina por Timina en el nucleótido 894)

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES:

Para realizar el siguiente estudio hemos extraído los pacientes de la población general que acudió a las consultas de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca entre octubre del 2005 y diciembre del 2007.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron:

1.-La edad: se incluyeron pacientes mayores de 60 años.

2.-La catarata: diagnosticada por lámpara de hendidura y clasificada según la LOCS III (The Lens Opacification Clasification System)(Chylack, Wolfe et al. 1993), en el cual se consideraron:

- Opacidad Nuclear (NO) con una puntuación del 0 al 6, donde 0 es el grado menor y 6 el grado máximo.

-Coloración Nuclear (NC) con una puntuación del 0 al 6, donde 0 es el grado menor y 6 el grado máximo.

- Cortex(C) con una puntuación del 0 al 5, donde 0 es el grado menor y 5 el grado máximo.

- Capsular Posterior (P) con una puntuación del 0 al 5, donde 0 es el grado menor y 5 el grado máximo.

3.-La agudeza visual: se seleccionaron como casos aquellos que alcanzaban una agudeza visual con la mejor corrección menor o igual de 0.5 (según la escala decimal de Monoyer (Gil del Río E. 1984)) (este es el criterio de inclusión mayor para incluir en Lista de Espera Quirúrgica actualmente en el sistema de Salud de Castilla y León (SACYL)) y como controles aquellos que alcanzaban la unidad, espontánea o con corrección.

Por otro lado se excluyeron aquellos pacientes que no cumplían estos criterios, y aquellos con cualquier otra enfermedad oftalmológica que originara la pérdida visual, para considerar solamente en el estudio aquellos en los que la catarata era la responsable.

Tras 2 años de recopilación de pacientes se obtuvieron 101 casos y 43 controles que se ajustaran a estos criterios de inclusión. Todos ellos

firmaron un consentimiento informado tanto para manejar sus datos clínicos como para la realización de un estudio genético.

De los 144 pacientes se recogieron datos de la historia clínica referentes a nombre, edad, sexo, y número de historia, y datos clínicos referidos a: Hipertensión arterial, Diabetes Mellitus, haber sido Fumador o Bebedor, Exposición a Ultravioleta y a Calor Local, y se les realizó una exploración oftalmológica completa como sigue: Agudeza Visual con y sin corrección, Biomicroscopía, Presión Intraocular, Retinografía y Fondo de Ojo, posteriormente se llevó a cabo una extracción de sangre y se realizó, por un lado analítica de Hierro (Hierro, Ferritina, Transferrina, Capacidad de Saturación de Hierro, e Índice de Saturación de Hierro) y por otro un análisis genético como se explicará más adelante.

3.2. ESTUDIO GENÉTICO

En cuanto al estudio genético, con todas las muestras recogidas se realizaron los siguientes pasos:

3.2.1. EXTRACCIÓN DE DNA

Para la extracción del DNA de sangre periférica seguimos un procedimiento clásico con degradación de proteínas con proteinasa K y purificación del ADN con solventes orgánicos.

Obtención de células mononucleadas de sangre periférica:

Se realizó una extracción de sangre en tubos de EDTA o citrato, nunca con heparina. Se centrifugaron los tubos durante 15 minutos a 1500 r.p.m. a 4 °C. Aparecieron 3 fases: la superior que contenía el plasma, la intermedia que presentaba un aspecto blanquecino y que contenía las células nucleadas de la sangre y la inferior o eritrocitaria. Se extrajo la capa de células nucleadas y se depositó en un tubo de plástico de 50 ml. Es importante no arrastrar hematíes, pero tampoco perder células nucleadas. Se rellenó hasta un volumen final de 50 ml. con ddH₂O, se mezcló por inversión y centrifugó durante 15 minutos a 1500 r.p.m. y a 4 °C. Se volvieron a centrifugar de nuevo los tubos con la sangre, (el H₂O rompe los hematíes por diferencia de presión osmótica). Se decantó el sobrenadante evitando perder el botón celular. Se recuperó la interfase y se

pasó al tubo de plástico. A continuación se le añadió de nuevo 50ml. de ddH₂O y se volvió a centrifugar durante 15 minutos a 1500 r.p.m. y a 4 °C. Se volvió a decantar el sobrenadante y se completó hasta 15 ml. con tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50 mM Tris-HCL pH 7.5; 25mM KCL; 5mM MgCl₂) (el tampón Fornace da la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos). Por último se centrifugó 10 minutos a 1500 r.p.m. a 4 °C y se decantó el sobrenadante.

Aislamiento del DNA total de alto peso molecular:

Las células nucleadas se resuspendieron en:

-Tampón Fornace	2125µlitros
-EDTA (0.5M pH 8)	100µlitros (10mM concentración final)
-Proteinasa K (20 mg/ml)	10µlitros (50µg/ml concentración final)

Todo ello se agitó en un vortex junto con SDS 10% 225µlitros (1% concentración final) y se rellenó hasta un volumen final de 2500 µlitros. Estos volúmenes se pudieron ajustar en función de la cantidad de células obtenidas en la extracción. La mezcla se incubó a 55 °C durante 8-16 horas

(J. Sambrook 1989). El tubo fue convenientemente rotulado y sellado con parafilm.

Purificación del DNA

Se añadió a ese mismo tubo $\frac{1}{2}$ volumen de fenol tamponado y $\frac{1}{2}$ volumen de CIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). Se mezcló vigorosamente y se centrifugó 10 minutos a 1800 r.p.m. a 4 °C. Es importante mantener el pH del fenol alrededor de 8 para prevenir que el DNA llegue a ser atrapado en la fase intermedia, entre la acuosa y la orgánica.

Una vez recuperada la fase superior se pasó a un tubo de 15 ml, evitando arrastrar la interfase proteica o la fase inferior y se le añadió un volumen de CIAA al tubo que contenía lo recuperado en el paso anterior. Se mezcló vigorosamente y centrifugó 10 minutos a 1800 r.p.m. a 4 °C.

Después de recuperar la fase superior se pasó a un tubo Corex, evitando arrastrar la interfase proteica o la fase inferior, al cual se le añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se tapó con Parafilm, y se mezcló por inversión hasta que apareció el DNA (el etanol absoluto hace precipitar el DNA). Se retiró el DNA del tubo Corex con una pipeta de 1ml

y se pasó a un tubo Eppendorf. Se le añadió 100µl. de etanol al 70% (lava el DNA) y se centrifugó durante 5 minutos; se dejó secar sobre un papel de filtro y se resuspendió el DNA en 200µl de ddH₂O estéril.

El grado de contaminación proteica del DNA y la concentración se calculó tras medir la absorbancia a 260 y 280 nm.

La muestra de ADN con una concentración aproximada entre 1,000 y 1,500 µg/mL, se almacenó en tubos Eppendorf[®] a -20 °C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación por microorganismos.

3.2.2. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

3.2.2.1. PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa genera “in Vitro” grandes cantidades de un determinado fragmento de DNA, a partir de cantidades mínimas del mismo.

Las DNA polimerasas necesitan una secuencia cebadora para iniciar la síntesis de una hebra complementaria de DNA indispensable para mantener la estabilidad de la información celular; ésta característica es aprovechada por la PCR para amplificar la secuencia de DNA deseada.

La amplificación es del orden de un millón de una determinada secuencia de DNA. Se utilizan 2 primers (cebadores oligonucleotídicos) complementarios a las secuencias situadas en los extremos del fragmento de DNA que se desea amplificar, se basa en el desarrollo de ciclos repetidos de desnaturalización de la doble hebra de DNA por calor, la hibridación de los 2 cebadores a sus secuencias complementarias y la síntesis de DNA gracias a la acción de una DNA polimerasa.

Se determina el fragmento de DNA específico que se desea amplificar encargando la síntesis de cebadores, es decir oligonucleótidos de secuencias complementarias al DNA que flanquea la región seleccionada de DNA.

Los cebadores sirven para definir los extremos del segmento de DNA que se quiere amplificar. En nuestro estudio se calentaron las cadenas de DNA que separaron en 2 hebras (desnaturalización), después las hebras se unieron con los cebadores (hibridación) orientándose correctamente para

que la 3^o fase (síntesis) en presencia de una DNA polimerasa y un exceso de trifosfatos de desoxirribonucleótidos tuviera lugar a lo largo de la región de DNA que los cebadores flanquean.

En cada ciclo (desnaturalización, hibridación y síntesis) se duplicó la cantidad del fragmento de DNA producido en el ciclo previo.

El número de ciclos en un experimento de PCR se sitúa entre 20 y 50, es inútil aumentar en más el número de ciclos puesto que la amplificación sigue un proceso exponencial hasta el ciclo 15-20 para alcanzar después una meseta.

El resultado de la PCR está en función del medio en el que tiene lugar la reacción y de la concentración de cada uno de los componentes; el problema más frecuente es que se amplifican otras secuencias inespecíficas.

El DNA es mejor si está perfectamente purificado, sin proteínas ni RNA, para ello seguimos el procedimiento antes comentado.

Para llevar a cabo el estudio mediante PCR multiplex de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1 se emplearon las siguientes condiciones: el control presentaba un cebador sentido (5'-CGCCATCTTGTGCTACATTGCCCG-3'), el GSTM1 presentaba un

cebador sentido (5'-ATCTTCTCCTCTTCTGTCTC-3') y otro antisentido (5'-TTCTGGATTGTAGCAGATCA-3') y el GSTT1 presentaba un cebador sentido (5'-TTCCTTACTGGTCCTACATCTC-3') y otro antisentido (5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'). El programa para la reacción de PCR consistía en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C: 30 segundos, 58 °C: 30 segundos, 72 °C: 42 segundos; finalmente se añadió un ciclo de 72 °C durante 8 minutos. Con esta reacción obtuvimos fragmentos de DNA de 450 pb. para GSTT1, 231 pb. para GSTM1 y 158 pb. para el control (Figura 8).

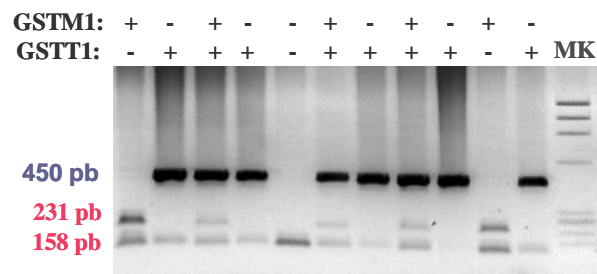


Figura 8. Fotos de los resultados obtenidos en el estudio mediante PCR de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1.

3.2.2.2. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

A. 5,10 METILÉNTETRAHIDROFOLATOREDUCTASA

Las muestras de ADN, tanto de pacientes como de controles, fueron amplificadas en dos reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa): en una de las PCRs se amplificaba el fragmento portador del nucleótido en posición 677, y en la otra el fragmento con el nucleótido en posición 1298. Para ello se utilizó el reactivo PCR Master Mix de Promega, que contiene 50 unidades/ml de Taq polimerasa tamponada a pH 8.5; 400µM de cada desoxinucleótido: dATP, dGTP, dCTP, dTTP; y 3mM de MgCl₂. Cada reacción de PCR tenía un volumen final de 25 µl: 12,5 µl de Master mix; 10,5 µl de agua libre de nucleasas; 0,75 µl de cada oligonucleótido cebador; y 0,5 µl de ADN. Como control negativo se utilizó un tubo de reacción con todos los componentes menos el DNA molde.

La amplificación para determinar la presencia de la mutación C677T fue llevada a cabo utilizando un cebador exónico sentido (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTG CGGGA-3') y otro intrónico antisentido (5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'). El programa para la reacción de PCR consistía en una desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5

minutos, seguido de 40 ciclos de 94° C: 1 minuto, 60° C: 1 minuto, 72° C: 1 minuto. Finalmente se añadió un ciclo de 70°C durante 10 minutos. Con esta reacción obtuvimos fragmentos de ADN de 198 pares de bases.

La amplificación para determinar la presencia de la mutación A1298C se llevó a cabo utilizando dos oligonucleótidos cebadores: Sentido (5'-CTTTGGGGAGCTGAA GGACTACTA-3') y Antisentido (5'-CACTTTGTGACCATTCGGTTTG-3')

El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 92°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 92° C: 1 minuto, 60° C: 1minuto, 72° C: 30 segundos, y un ciclo final de 72°C durante 7 minutos. Con esta reacción obtuvimos fragmentos de ADN de 163 pares de bases (Figura 9).

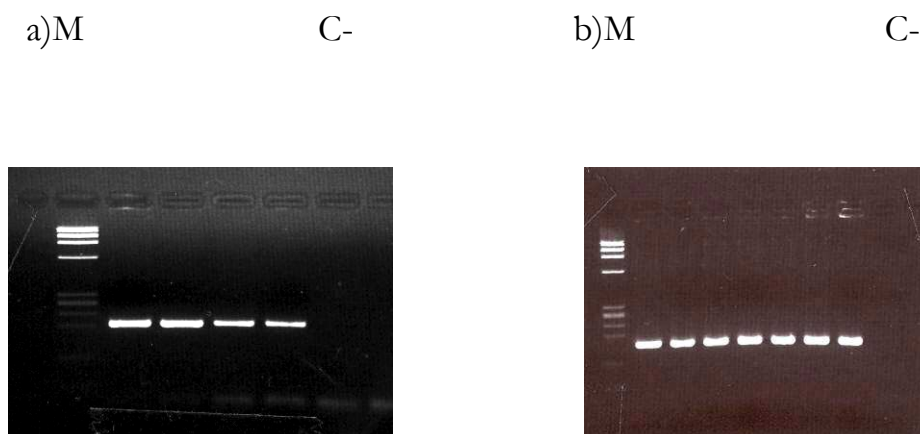


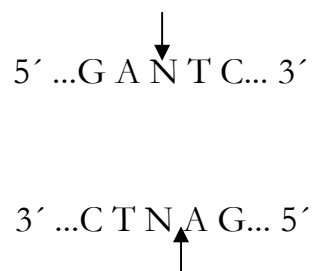
Figura 9: a) Fragmentos de PCR de 198 pb que contienen la región genómica donde se localiza el nucleótido 677 del gen MTHFR. b) Fragmentos de PCR de 163 pb que contienen la región genómica donde se localiza el nucleótido 1298 del gen MTHFR.

M: marcador de tamaño. C-: Control negativo.

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS

Los genotipos 677 y 1298 del gen MTHFR fueron determinados por digestión de los fragmentos amplificados por PCR con endonucleasas de restricción.

Para la mutación C677T se utilizó la enzima de restricción Hinf I la cual reconoce como sitio de corte la secuencia:



La reacción de digestión con Hinf I fue preparada con: 15 μ l del producto de PCR, 2 μ l del tampón R+ (10 mM Tris-HCl pH 8.5; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml BSA), y 1 μ l de enzima. Después, la mezcla se incubó durante un mínimo de cuatro horas en un baño a 37 °C.

Los productos de la digestión diferían en función del genotipo de la muestra:

-En los individuos homocigotos para el alelo C, la enzima no reconoció ningún sitio de corte, por lo que sólo apareció un fragmento de 198 pb.

-En los individuos homocigotos para el alelo T se generó un sitio de corte reconocido por la enzima en el fragmento amplificado de 198 pb. obteniéndose dos fragmentos: uno de 175 pb. y otro de 23 pb.

-En los individuos heterocigóticos se obtuvieron tres fragmentos de 198 , de 175, y de 23 pb.

Los fragmentos fueron visualizados en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio, tras la electroforesis horizontal de los productos de la digestión, al exponerlo a luz U.V. (Figura 10).

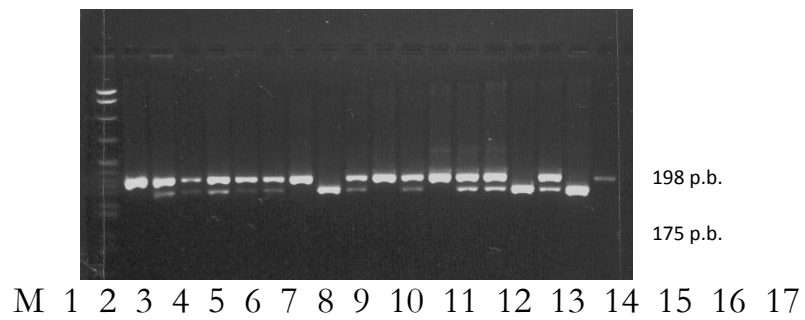
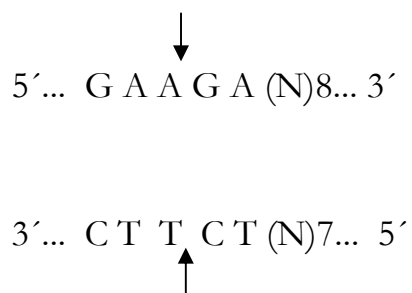


Fig.10: Fragmentos de digestión del polimorfismo 677 del gen MTHFR. Los dos fragmentos visibles son de 175 pb. y de 198 pb.

M: marcador de tamaño. Carriles 1, 8, 11, 13: homocigotos silvestres 677CC. Carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16: Heterocigotos 677CT. Carriles 9, 15, 17: Homocigotos 677TT.

El fragmento de 23 pb. no se ve.

El polimorfismo A1298C se estudió empleando la enzima Mbo II, la cual reconoce como sitio de corte la secuencia:



La reacción de digestión con Mbo II fue preparada con: 12.5 μ l del producto de PCR, 2 μ l del tampón B (100mM Tris-HCl pH 7.5; 100mM MgCl₂; 0.1 mg/ml BSA), 9,5 μ l ddH₂O, y 0,5 μ l de enzima. Esta mezcla se incubó durante al menos cuatro horas en un baño a 37 ° C.

Los productos de esta digestión difieren en función del genotipo de la muestra:

-En aquellos individuos homocigotos AA el fragmento de 163 pb dió lugar por un lado a dos fragmentos de 56 y 28 pb, y, por otro, a una serie de fragmentos de menor tamaño: 31, 30 y 18 pb.

-En los individuos con los dos alelos CC se eliminó un sitio de corte, por ello el patrón de fragmentos lo componen: un fragmento de 84 pb y los más pequeños de 31,30 y 18 pb.

-En los individuos heterocigotos AC aparecieron fragmentos de 84, 56, 31, 30, 28 y 18 pb.

Dichos fragmentos se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio, lo cual permitió visualizar las bandas al exponerlo a luz U.V. (Figura 11).

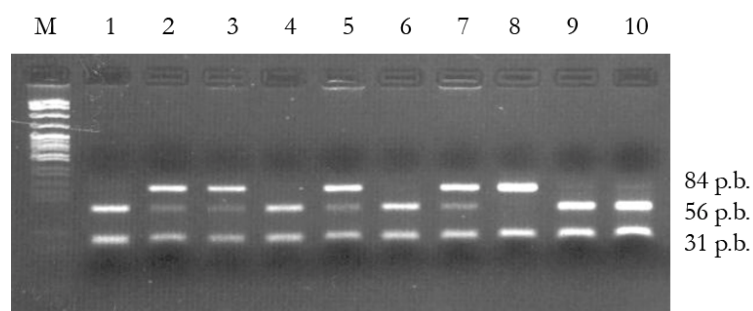


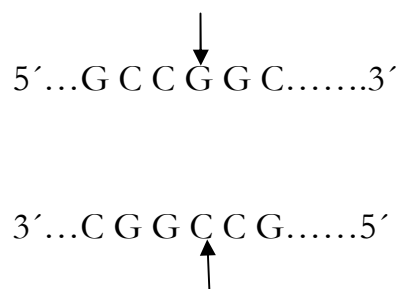
Figura 11: Fragmentos que se observaron tras la digestión con la enzima de restricción Mbo II del producto de PCR que contiene el polimorfismo del nucleótido 1298 del gen MTHFR.

Las tres bandas visibles son respectivamente la de 84, 56 y 31 p.b.. M: Marcador de tamaño. Carriles 1,4,6,9,10 homocigotos AA, carriles 2,3,5,7, heterocigotos AC, carril 8 homocigoto CC.

B. ÓXIDO NÍTRICO

En el caso del polimorfismo -786TC se realizó una amplificación de fragmentos mediante PCR igual que en el caso anterior y se realizó una digestión por endonucleasa de restricción; en el caso del polimorfismo G894T, la PCR se realizó por sondas Taqman.

El estudio del polimorfismo -786TC del gen NOS3 se llevó a cabo mediante PCR y digestión con la enzima de restricción NaeI, para ello se utilizaron dos cebadores, uno sentido (5'-TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3') y otro antisentido (5'-GCCTCCACCCCACCCTGTC-3'), la desnaturalización inicial consistía en un ciclo de 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C: 1 minuto, 60 °C: 1 minuto, 72 °C: 1 minuto; finalmente se añadió un ciclo de 72 °C durante 7 minutos. Con esta reacción se obtuvieron fragmentos de 180 pb. (figura 12A) La digestión con la enzima de restricción NaeI reconoce como sitio de corte la secuencia:



La reacción de digestión con NaeI fue preparada con: 15 μ l del producto de PCR, 2 μ l del tampón R+ (10 mM Tris-HCl pH 8.5; 10 mM

MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml BSA), y 1 µl de enzima. Después, la mezcla se incubó durante un mínimo de cuatro horas en un baño a 37 °C.

Los productos de la digestión diferían en función del genotipo de la muestra (figura 12B):

-En individuos homocigotos T, aparecieron 2 fragmentos de 140 y 40 pb.

- En individuos homocigotos C, aparecieron otros 2 fragmentos 90 y 50 pb.

-En individuos heterocigotos TC, se obtuvieron 4 fragmentos de 140, 90, 50 y 40 pb.

Los fragmentos fueron visualizados en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio, tras la electroforesis horizontal de los productos de la digestión, al exponerlo a la luz U.V. (Figura 12).

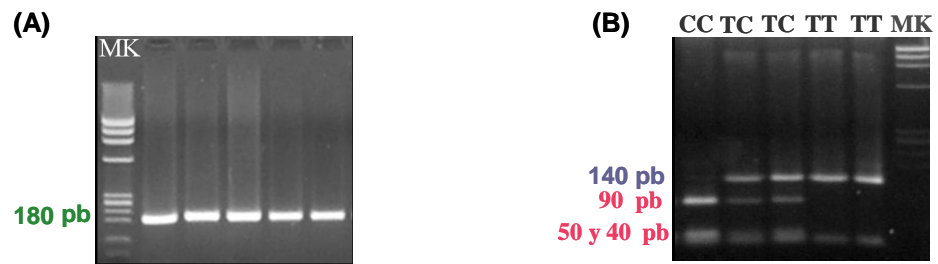


Figura 12. Fotos de los resultados obtenidos en el estudio mediante PCR (A) y digestión con enzimas de restricción (B) del polimorfismo -786TC del gen NOS3.

En el siguiente esquema (figura 13) se resume todo lo anterior:

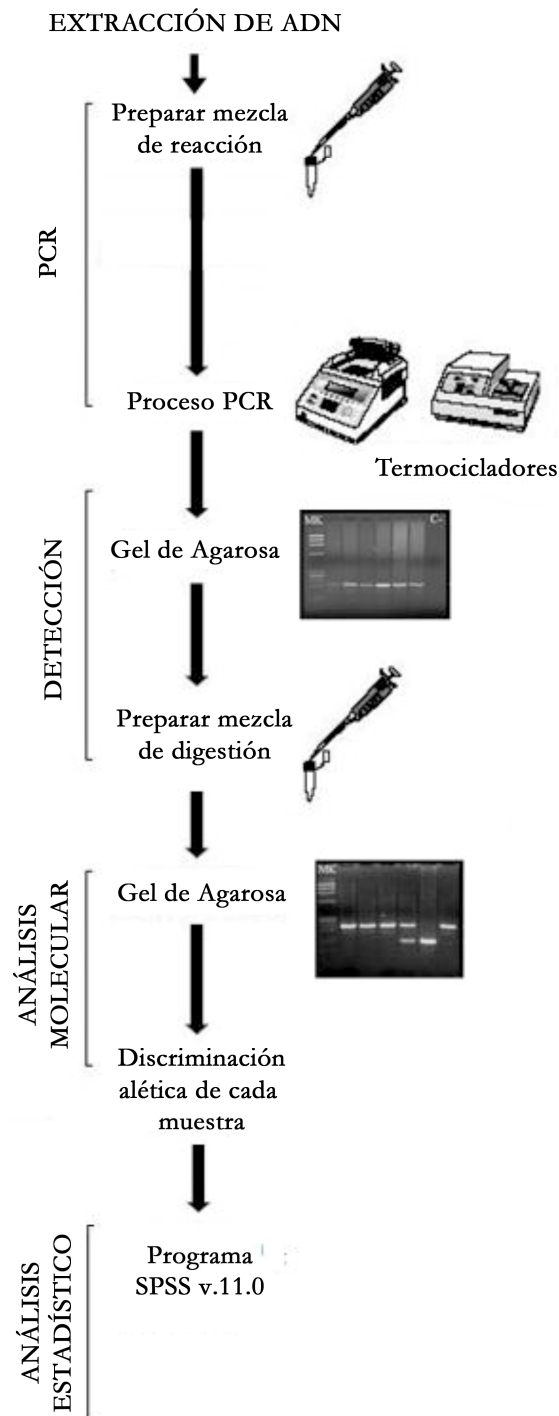


Figura 13: Discriminación alélica mediante PCR y digestión con enzimas de restricción.

En la PCR con sondas Taqman, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR con sondas Taqman incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR con sondas Taqman pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Para la discriminación alélica nosotros empleamos sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas de hibridación específica son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar

con el espectro de absorción de la segunda. En la Tabla 1 se relacionan los fluorocromos más empleados y sus espectros de excitación y emisión. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM.

Tabla 1. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR con sondas Taqman.

Fluorocromo	Máx λ_{abs} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
VIC	538	554
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460,502	526,650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480,565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480,565	613
Rojo de Tejas	596	615
Homodímero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermusaquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 14).

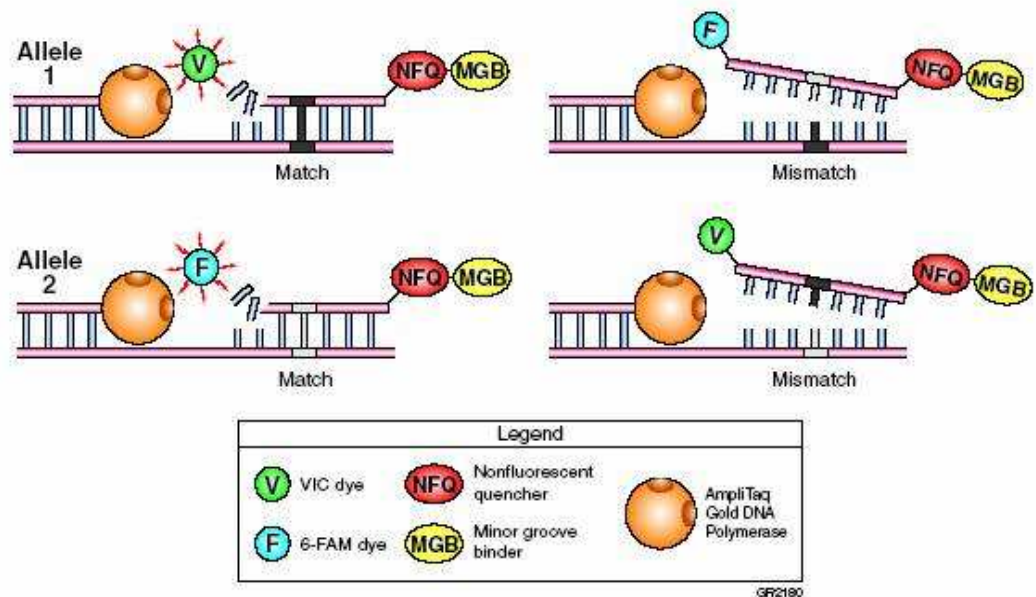


Figura 14. Mecanismo de la PCR con sondas Taqman.

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

Nuestro estudio se realizó en un termociclador de Applied Biosystems que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados.

La determinación de las variantes alélicas del polimorfismo G894T del gen NOS3 se realizó con los cebadores eNosGlu298fw: CGG TCG CTT CGA CGT GCT y eNosGlu298Rv: CCA GTC AAT CCC TTT GGT GTC. El alelo G se marcó con VIC y el alelo T con FAM. Una vez realizada la amplificación el detector incorporado al equipo discrimina los alelos amplificados tal y como se representa en la figura 15.

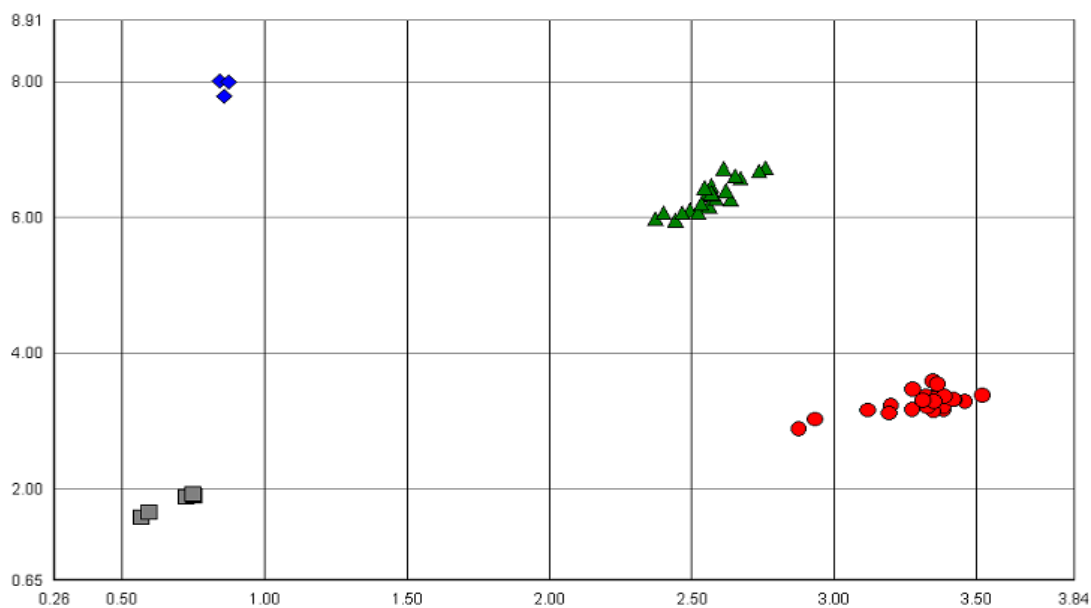


Figura 15: PCR por sondas taqman.

3.3 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos recogidos fueron tratados estadísticamente con el programa SPSS 16.0.

En primer lugar se realizó un análisis exploratorio de los datos donde se prestó especial atención en la comprobación o corrección de los valores extremos presentes en alguna de las variables estudiadas.

Una vez revisados los datos correspondientes a los 144 pacientes en estudio, se realizó un estudio descriptivo con el objeto de clasificar, representar y, en definitiva, resumir, el conjunto de datos. Para ello se utilizaron fundamentalmente representaciones gráficas: histogramas, diagramas de barras, diagramas de sectores y *box plots* (diagramas de caja). Por otro lado, se presentan en forma de tabla, distribuciones de frecuencias, así como un resumen de los estadísticos más usuales (media, desviación típica, mediana, etc.) en el caso de variables de tipo cuantitativo.

En toda la parte de descriptiva se presentan los resultados de cada variable no sólo en función de si el paciente tiene o no cataratas, sino también con su distribución por sexo y edad, categorizada ésta en dos grupos: de 60 a 74 años, y de 75 y más años.

Para la *Agudeza visual*, como posible método diagnóstico, se calcula la sensibilidad y la especificidad de la prueba.

Por último, se completa el estudio estadístico con un apartado de estadística inferencial donde se realizan distintas comparaciones entre variables.

Para estudiar si existe relación o asociación entre dos variables de tipo categórico, se realizó un estudio de *tablas de contingencia* donde se presentaron además de la tabla de frecuencias observadas, los porcentajes por filas y/o columnas, el valor del estadístico chi-cuadrado de Pearson con los grados de libertad correspondientes en cada caso, así como el p-valor, que nos indica si los resultados han sido:

- No significativos: lo que nos señala que, con los datos disponibles, no hay relación entre las variables ($p > 0,05$).
- Probablemente significativos: hay relación entre las variables ($0,01 < p < 0,05$).
- Altamente significativos: hay relación entre las variables ($p < 0,01$).

Como indicador de riesgo de padecer cataratas, en el caso de tablas 2x2, se calculó la *odds ratio* (OR). Si no hay relación entre el factor y la enfermedad, el valor de la OR sería estadísticamente igual a 1; si el factor aumenta la probabilidad de padecer la enfermedad, la OR será mayor que 1

y si la disminuye, será menor que 1. Se calcularon los intervalos de confianza correspondientes con un nivel de confianza del 95%.

Para estudiar si una variable cuantitativa presenta diferencias entre dos grupos de pacientes, estudiamos en primer lugar la normalidad de los datos de forma gráfica. En todos los casos rechazamos la hipótesis de normalidad, por lo tanto hemos tenido que recurrir a un test no paramétrico para realizar la prueba. El test elegido en este caso ha sido el *test U de Mann-Whitney* para datos independientes. Como en los casos anteriores, se presenta una tabla con el valor del estadístico de Mann-Whitney, y el p-valor correspondiente. Los posibles resultados son los mismos que los ya explicados, pero la interpretación de los resultados es diferente, dado que las variables que entran en juego en un análisis y otro son de distinto tipo.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS CLÍNICOS

Se han estudiado un total de 144 pacientes del Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca mayores de 60 años, de los cuales 101 tenían catarata y 43 no.

De los 101 pacientes diagnosticados de cataratas se observó que sólo 4.95% eran nucleares puras (5) y el resto, 95.05%, eran de componente mixto (96): 90.09% eran corticonucleares (91) y 4.95% eran nucleares y subcapsulares posteriores (5). Si valoramos cada componente de forma individual y según la LOCS III, vemos: que de las 101 cataratas que tienen componente nuclear, la distribución es como sigue: N1, 0.99%, 1; N2, 18.81%, 19; N3, 44.55%, 45; N4, 15.84%, 16; N5, 14.85%, 15; N6, 4.95%, 5; de las 91 con componente cortical la distribución es: C1, 5.49%, 5; C2, 30.76%, 28; C3, 29.6%, 27; C4, 19.7%, 18; C5, 14.2%, 13; y de las que tienen componente subcapsular posterior: P1, 0%, 0; P2, 0%, 0; P3, 40%, 2; P4, 60%, 3; P5, 0%, 0.

Se ha realizado una descripción de la muestra y un análisis inferencial de cada una de las variables.

4.1.1. SEXO

La distribución de los pacientes incluidos en nuestro estudio en función del género se muestra en la figura 16, observándose un mayor porcentaje de hombres entre los pacientes con cataratas y de mujeres en los pacientes sin cataratas.

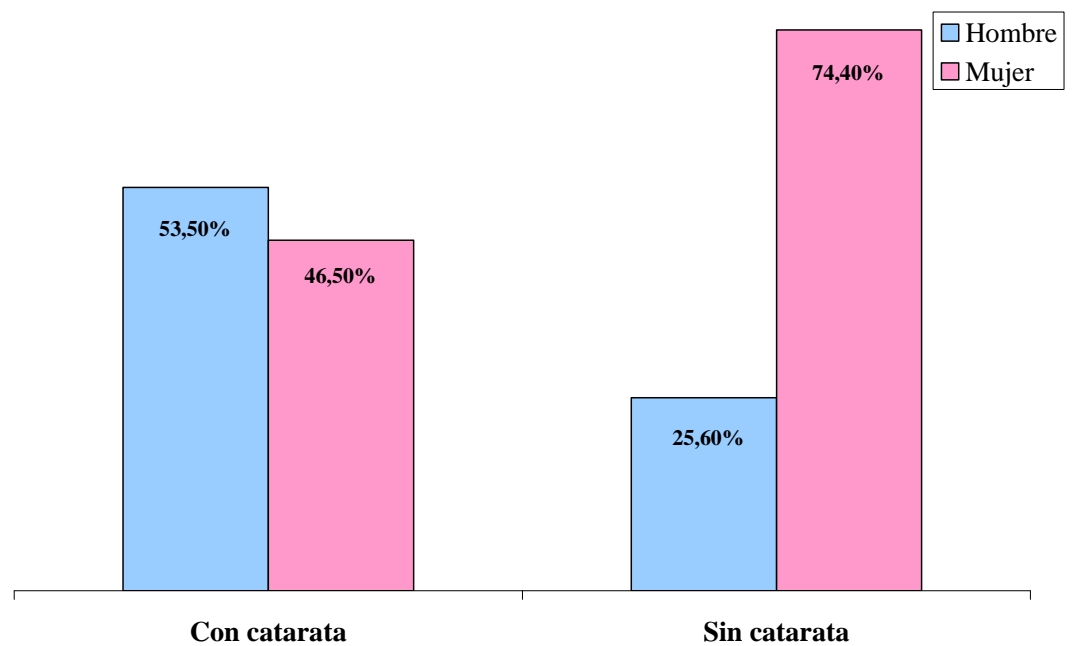


Figura 16: Distribución por sexo de los pacientes en estudio.

En la tabla 2 mostramos los resultados de analizar la presencia de cataratas en función del sexo. Como podemos observar existe relación estadísticamente significativa entre tener o no cataratas y el sexo del paciente ($p < 0,05$).

Tabla 2: Distribución por sexo.

		Sexo		Total	
		Hombre	Mujer		
Catarata	Sí	Recuento	54	47	101
		% de Catarata	53,5%	46,5%	100,0%
		% de Sexo	83,1%	59,5%	70,1%
	No	Recuento	11	32	43
		% de Catarata	25,6%	74,4%	100,0%
		% de Sexo	16,9%	40,5%	29,9%
Total		Recuento	65	79	144
		% de Catarata	45,1%	54,9%	100,0%
		% de Sexo	100,0%	100,0%	100,0%

$P=0,002$; OR: 3,342(1,519-7,355)

4.1.2. EDAD

La edad media de los pacientes con catarata fue de casi 74 años (desviación típica de 6,5 años), mientras que la edad media de los pacientes sin catarata fue de 67 (desviación típica de 4,5 años) (Tabla 3).

Tabla 3: Edad de los pacientes en estudio.

		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
Edad Catarata	Sí	73,79	6,53	60,00	91,00	74,00
	No	67,14	4,45	60,00	77,00	65,00

En las figuras 17 y 18 mostramos cómo la variable edad presenta una distribución más o menos simétrica en los pacientes con catarata y marcadamente asimétrica en los pacientes sin catarata.

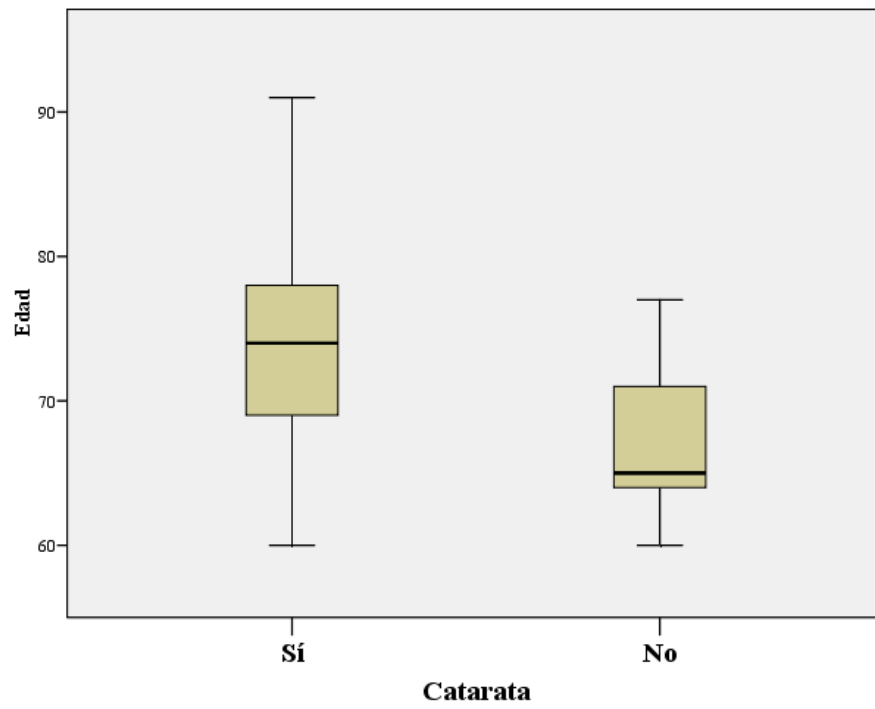


Figura 17: Box plots de la edad de los pacientes con y sin cataratas.

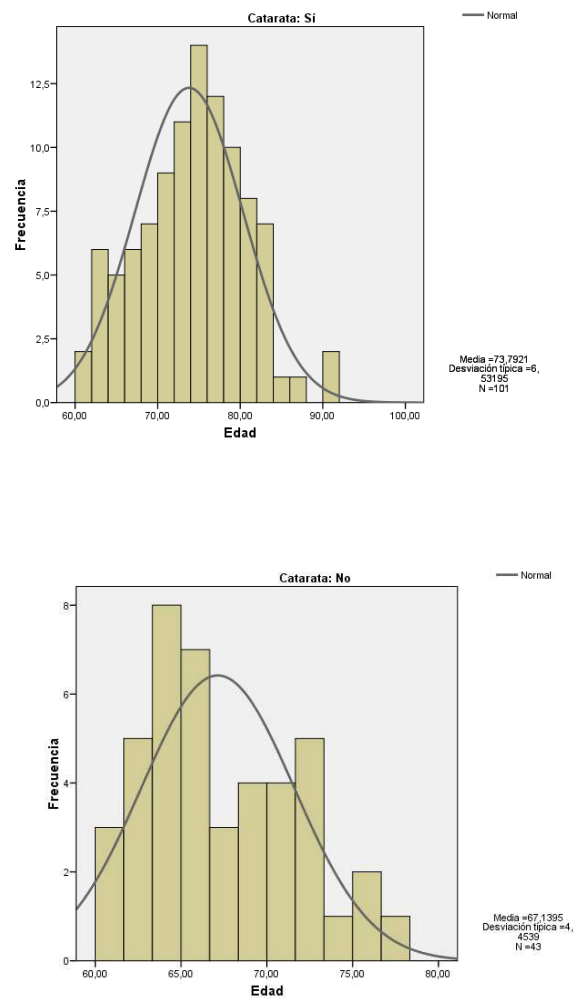


Figura 18: Histogramas de la edad de los pacientes con y sin cataratas.

Al agrupar la variable edad en dos categorías, dividiéndolos en mayores y menores de 75 años (Tabla 4), observamos que el tener o no cataratas depende del grupo de edad del paciente, siendo más frecuente tener cataratas en los pacientes de mayor edad.

Tabla 4: Distribución por edad.

		Edad		Total
		De 75 y más años	De 60 a 74 años	
Catarata	Recuento	47	54	101
	Sí % de Catarata	46,5%	53,5%	100,0%
	% de Edad	94,0%	57,4%	70,1%
	Recuento	3	40	43
	No % de Catarata	7,0%	93,0%	100,0%
	% de Edad	6,0%	42,6%	29,9%
Total	Recuento	50	94	144
	% de Catarata	34,7%	65,3%	100,0%
	% de Edad	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,000; OR: 11,605(3,369-39,970)

4.1.3. METABOLISMO DEL HIERRO

Analizamos los parámetros más habituales relacionados con el metabolismo del hierro en los pacientes incluidos en el estudio (Tabla 5).

Tabla 5: Descripción de datos clínicos.

	Catarata	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
Hierro	Sí	88,8	41,8	20,0	267,0	79,0
	No	95,9	23,1	57,0	162,0	92,0
Ferritina	Sí	160,5	131,4	10,0	717,0	132,0
	No	167,2	98,2	22,0	457,0	151,0
Transferrina	Sí	218,6	53,9	75,0	355,0	219,0
	No	275,8	98,7	184,0	695,0	256,0
Capacidad de saturación hierro	Sí	277,0	67,8	95,0	451,0	283,0
	No	325,0	39,1	272,0	419,0	321,0
Índice de saturación	Sí	34,5	21,4	11,0	202,0	31,0
	No	38,2	54,9	16,0	385,0	29,0

Las cinco variables continuas estudiadas en la tabla anterior (Tabla 5) se alejan de tener una distribución aproximadamente normal. La variable que más se aleja de tener una distribución normal es el Índice de saturación.

En las tablas 6 y 7 se muestra una descripción de los datos referentes a la analítica de hierro de los pacientes con catarata según el sexo y según edad.

Tabla 6: Datos clínicos de pacientes con cataratas según sexo.

	Sexo	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
Hierro	Hombre	94,6	41,5	33,0	229,0	85,0
	Mujer	82,2	41,5	20,0	267,0	77,0
Ferritina	Hombre	204,6	136,7	21,0	717,0	176,5
	Mujer	110,0	105,4	10,0	597,0	88,0
Transferrina	Hombre	210,5	50,9	88,0	354,0	216,0
	Mujer	227,8	56,2	75,0	355,0	226,0
Capacidad saturación hierro	Hombre	267,3	64,6	112,0	450,0	274,0
	Mujer	288,2	70,4	95,0	451,0	299,0
Índice de saturación	Hombre	39,2	25,9	11,0	202,0	34,5
	Mujer	29,0	12,8	12,0	77,0	26,0

Tabla 7: Descripción de datos clínicos de pacientes con cataratas según grupos de edad.

	<i>Edad</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación típica</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mediana</i>
<i>Hierro</i>	<i>60-74</i>	91,1	43,7	20,0	267,0	84,5
	<i>≥75</i>	86,3	39,7	33,0	229,0	78,0
<i>Ferritina</i>	<i>60-74</i>	147,9	141,2	10,0	717,0	101,5
	<i>≥75</i>	175,1	118,9	12,0	597,0	156,0
<i>Transferrina</i>	<i>60-74</i>	223,6	55,4	75,0	354,0	226,0
	<i>≥75</i>	212,8	52,0	88,0	355,0	210,0
<i>Capacidad saturación hierro</i>	<i>60-74</i>	283,3	71,0	95,0	450,0	287,0
	<i>≥75</i>	269,8	64,0	112,0	451,0	268,0
<i>Índice de saturación</i>	<i>60-74</i>	35,3	26,7	11,0	202,0	29,5
	<i>≥75</i>	33,5	13,0	11,0	66,0	32,0

Completamos el análisis de los parámetros de metabolismo férrico mediante tests no paramétricos (test U de Mann Whitney o W de Wilcoxon) independientes para cada una de las variables estudiadas, ya que, como se objetivó en el apartado anterior, ninguna de estas variables se debe considerar normal.

Tabla 8: Estadísticos de contraste(a).

	U de Mann-Whitney	W de Wilcoxon	Z	p-valor
Hierro	1707,000	6858,000	-2,028	0,043
Ferritina	1942,500	7093,500	-1,000	0,317
Transferrina	1108,500	6259,500	-4,641	0,000
Capacidad saturación hierro	1150,000	6301,000	-4,460	0,000
Índice de saturación	1987,500	2933,500	-,804	0,422

a Variable de agrupación: Catarata (Sí/No)

Respecto a la Ferritina y al índice de saturación, no se han encontrado diferencias significativas entre los valores medianos de los pacientes con catarata y los pacientes sin ella.

Sin embargo, en el caso de la transferrina y de la capacidad de saturación del hierro, sí que se encontraron diferencias significativas entre los valores medianos de los pacientes con y sin catarata, de hecho los valores son menores en pacientes con catarata.

Respecto al Hierro se habla de un nivel de significación límite, porque si trabajamos con una significación del 5% concluimos que existen

diferencias significativas entre el valor mediano de pacientes con y sin catarata, pero si trabajamos con una significación del 1% concluimos que no existen diferencias.

4.1.4. RESULTADOS OFTALMOLÓGICOS

4.4.4.1. Presión intraocular:

En las siguientes tablas se describen los resultados del análisis de la presión intraocular, tanto a nivel global (Tabla 9) como divididos por sexo (Tabla 10) y por edad (Tabla 11).

Tabla 9: Presión intraocular.

	Catarata	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
Presión intraocular	Sí	15,2	2,8	9,0	24,0	15,0
	No	16,8	2,2	12,0	22,0	16,0

Tabla 10: Datos de presión intraocular en pacientes con catarata según sexo.

	Catarata	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
Presión intraocular	Hombre	15,5	2,8	9,0	22,0	16,0
	Mujer	14,8	2,7	11,0	24,0	14,0

Tabla 11: Datos clínicos de pacientes con cataratas según grupo de edad.

	Edad	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
Presión intraocular	60-74	14,9	2,5	11,0	22,0	14,0
	≥75	15,5	3,1	9,0	24,0	16,0

Aunque la presión intraocular podría considerarse más o menos normal, realizamos también el estudio empleando test no paramétricos independientes confirmando la existencia de diferencias significativas en el valor medio de presión intraocular entre pacientes con catarata y sin ella; siendo menor la presión intraocular en pacientes con catarata.

Tabla 12: Estadístico de contraste (a).

	U de Mann-Whitney	W de Wilcoxon	Z	p-valor
Presión intraocular	1370,500	6521,500	-3,551	0,000

Variable de agrupación: Catarata (Si/No)

4.1.4.2. Agudeza visual:

En relación con el análisis de la Agudeza visual, y ya que se toma como método diagnóstico, decidimos recodificar esta variable en las tres categorías que aparecen en la Tabla 13, tomando siempre la mayor agudeza visual de los dos ojos del paciente.

Tabla 13: Agudeza visual.

	Catarata				
	Sí		No		
	Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna	
Agudeza visual	Menos de 0.3	46	45,5%	0	,0%
	De 0.3 a 0.5	52	51,5%	0	,0%
	Más de 0.5	3	3,0%	43	100,0%
	Total	101	100,0%	43	100,0%

Como podemos observar en la Tabla 14, la agudeza visual es un método diagnóstico con una sensibilidad alta y, por lo tanto, útil para descartar la enfermedad, y con una especificidad también alta, por lo tanto útil para confirmar la enfermedad.

Tabla 14: Agudeza visual recodificada en dos categorías.

		Agudeza visual		Total
		$\leq 0,5$	$> 0,5$	
Catarata	Sí	98	3	101
	No	0	43	43
	Total	98	46	144

La *sensibilidad* ($P (\leq 0,5/Sí)$) es de 0,97, es decir, el 97% de los pacientes con cataratas tiene una agudeza visual menor o igual de 0,5.

La *especificidad* ($P (> 0,5/No)$) es de 1, es decir, el 100% de los pacientes sin catarata tiene una agudeza visual mayor de 0,5.

En las tablas 15 y 16 los 101 pacientes con catarata se muestran estratificados por la agudeza visual en 3 categorías y divididos por sexo y por edad.

Tabla 15: Agudeza visual de los pacientes con cataratas según sexo.

		Sexo			
		Hombre		Mujer	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
Agudeza visual	Menos de 0.3	30	55,6%	16	34,0%
	De 0.3 a 0.5	23	42,6%	29	61,7%
	Más de 0.5	1	1,9%	2	4,3%
	Total	54	100,0%	47	100,0%

Tabla 16: Agudeza visual de los pacientes con cataratas según grupo de edad.

	Edad				
	De 60 a 74 años		De 75 y más años		
	Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna	
Agudeza visual	Menos de 0.3	24	44,4%	22	46,8%
	De 0.3 a 0.5	27	50,0%	25	53,2%
	Más de 0.5	3	5,6%	0	0,0%
	Total	54	100,0%	47	100,0%

4.1.5. FACTORES DE RIESGO:

La valoración de factores de riesgo sistémicos tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo, alcoholismo, exposición a la luz ultravioleta, y la exposición al calor, se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17: Pacientes según factores de riesgo.

		Catarata			
		Sí		No	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
Hipertensión arterial	Sí	60	59,4	22	51,2
	No	41	40,6	21	48,8
	Total	101	100,0	43	100,0
Diabetes Mellitus	Sí	16	15,8	11	25,6
	No	85	84,2	32	74,4
	Total	101	100,0	43	100,0
Fumador	Sí	18	17,8	3	7,0
	No	83	82,2	40	93,0
	Total	101	100,0	43	100,0
Alcohol	Sí	10	9,9	0	0,0
	No	91	90,1	43	100,0
	Total	101	100,0	43	100,0
Exposición ultravioleta	Sí	28	27,7	5	11,6
	No	73	72,3	38	88,4
	Total	101	100,0	43	100,0
Exposición calor	Sí	9	8,9	2	4,7
	No	92	91,1	41	95,3
	Total	101	100,0	43	100,0

En los diagramas de barras de las figuras 20, 21 y 22 podemos observar que, excepto para pacientes diabéticos, siempre hay mayor porcentaje de pacientes con factor de riesgo entre los pacientes con cataratas que entre los pacientes sin cataratas.

En el caso de la *Diabetes Mellitus* ocurre justo lo contrario, hay mayor porcentaje de diabéticos en el grupo de pacientes sin cataratas, que en el grupo de pacientes con cataratas. Dentro del grupo de diabéticos con catarata, hemos distinguido entre los insulino dependientes y los no insulino dependientes, como puede verse en la figura 19.

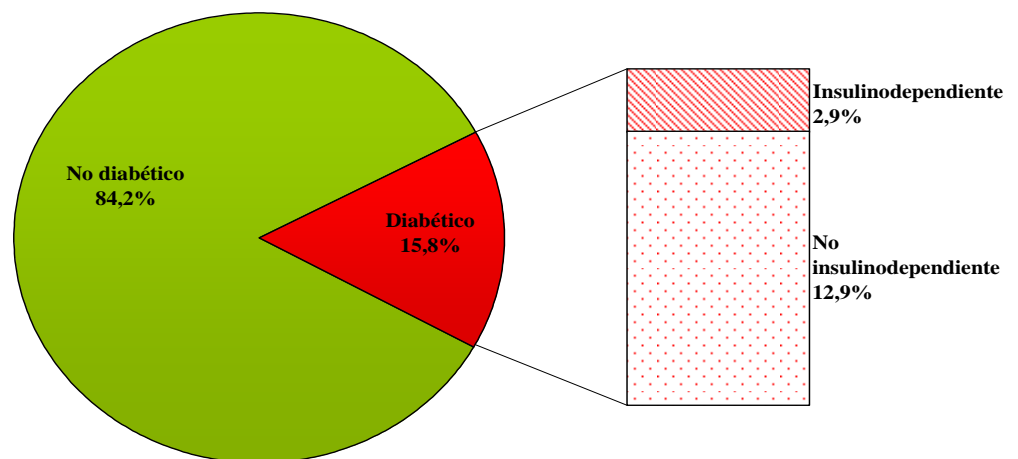


Figura 19: Distribución de pacientes con cataratas según factor de riesgo: Diabetes Mellitus.

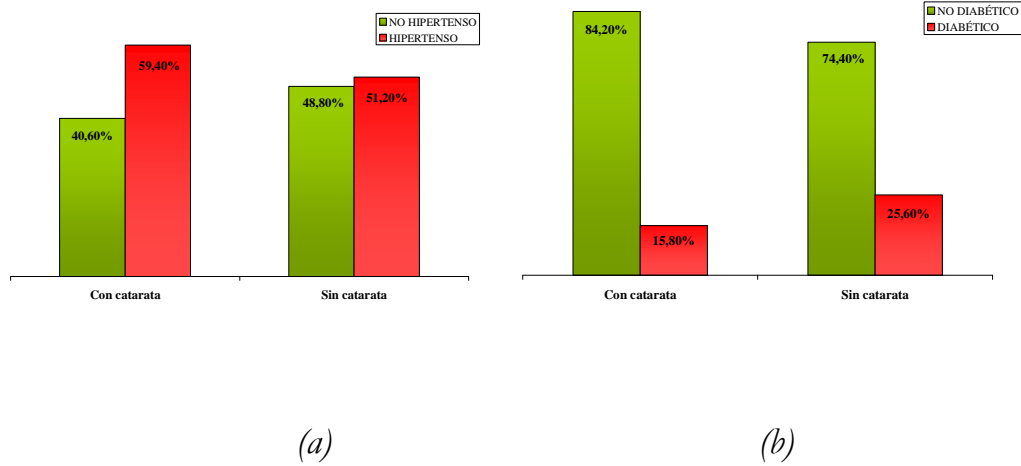


Figura 20: Distribución de pacientes con y sin cataratas según factor de riesgo: (a) Hipertensión y (b) Diabetes Mellitus.

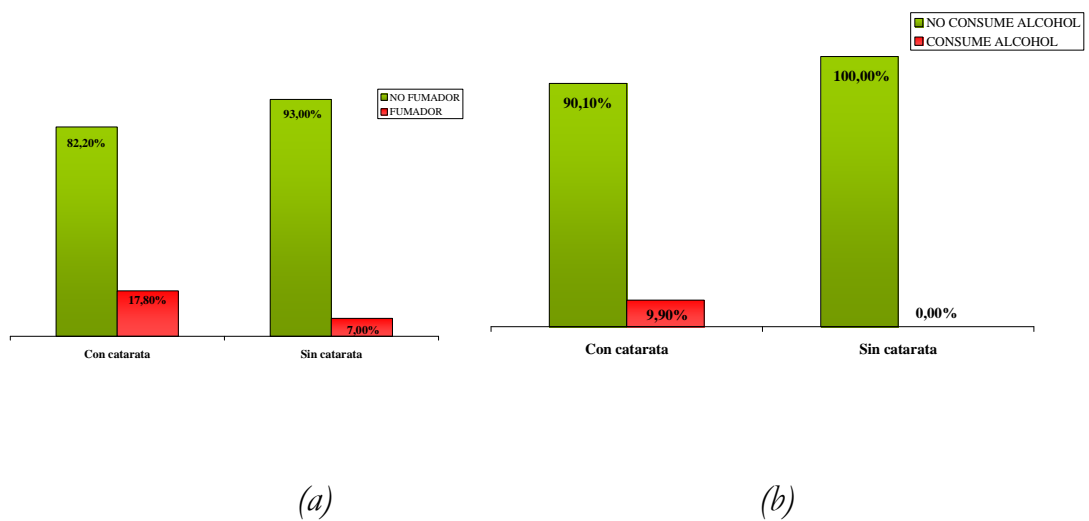


Figura 21: Distribución de pacientes con y sin cataratas según factor de riesgo: a) Tabaco y (b) Alcohol.

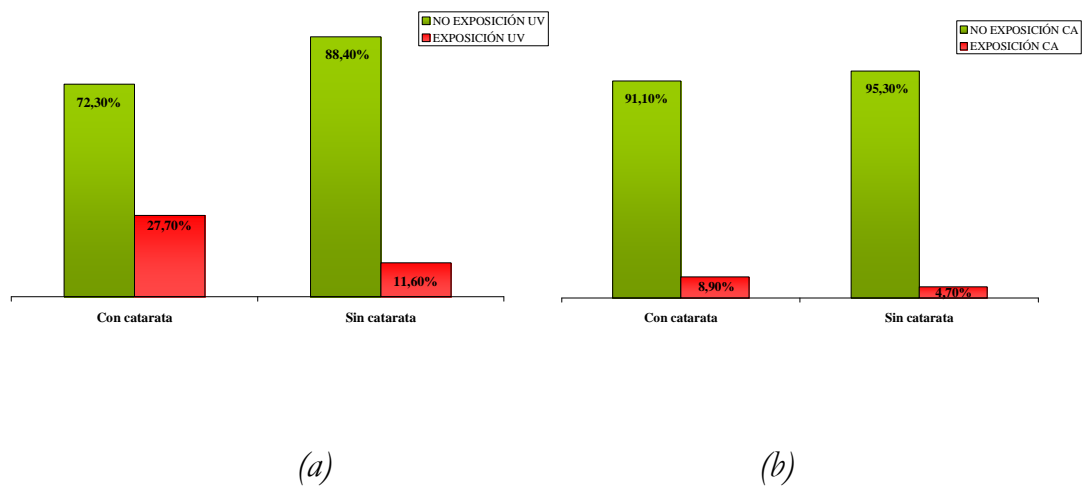


Figura 22: Distribución de pacientes con y sin cataratas según factor de riesgo: (a) Exposición a rayos ultravioleta y (b) Exposición a calor.

En las siguientes tablas mostramos los resultados de la valoración de los factores de riesgo de los pacientes con catarata, en función del sexo (Tabla 18) y la edad (Tabla 19) de los mismos.

Tabla 18: Factores de riesgo de pacientes con cataratas según sexo.

		Sexo			
		Hombre		Mujer	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
Hipertensión arterial	Sí	30	55,6	30	63,8
	No	24	44,4	17	36,2
	Total	54	100,0	47	100,0
Diabetes Mellitus	Sí	10	18,5	6	12,8
	No	44	81,5	41	87,2
	Total	54	100,0	47	100,0
Fumador	Sí	18	33,3	0	0,0
	No	36	66,7	47	100,0
	Total	54	100,0	47	100,0
Alcohol	Sí	10	18,5	0	0,0
	No	44	81,5	47	100,0
	Total	54	100,0	47	100,0
Exposición ultravioleta	Sí	19	35,2	9	19,1
	No	35	64,8	38	80,9
	Total	54	100,0	47	100,0
Exposición calor	Sí	7	13,0	2	4,3
	No	47	87,0	45	95,7
	Total	54	100,0	47	100,0

A nivel descriptivo, observamos que en los 101 pacientes con cataratas de la muestra hay mayor porcentaje de mujeres hipertensas que de hombres. Por el contrario, es superior el porcentaje de hombres diabéticos, fumadores, que consumen alcohol o que han estado expuestos a rayos ultravioleta o a calor.

Tabla 19: Factores de riesgo de pacientes con cataratas según grupo de edad.

		Edad			
		De 60 a 74 años		De 75 y más años	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
Hipertensión arterial	Sí	31	57,4	29	61,7
	No	23	42,6	18	38,3
	Total	54	100,0	47	100,0
Diabetes Mellitus	Sí	8	14,8	8	17,0
	No	46	85,2	39	83,0
	Total	54	100,0	47	100,0
Fumador	Sí	10	18,5	8	17,0
	No	44	81,5	39	83,0
	Total	54	100,0	47	100,0
Alcohol	Sí	5	9,3	5	10,6
	No	49	90,7	42	89,4
	Total	54	100,0	47	100,0
Exposición ultravioleta	Sí	12	22,2	16	34,0
	No	42	77,8	31	66,0
	Total	54	100,0	47	100,0
Exposición calor	Sí	5	9,3	4	8,5
	No	49	90,7	43	91,5
	Total	54	100,0	47	100,0

A nivel descriptivo, vemos que en los 101 pacientes con cataratas de la muestra, hay mayor porcentaje de menores de 75 años fumadores o que hayan estado expuestos a calor que de 75 y más años. Por el contrario, es superior el porcentaje de pacientes de 75 y más años hipertensos, diabéticos, que consumen alcohol o que han estado expuestos a rayos ultravioleta.

4.1.5.1. Hipertensión arterial

En la tabla Tabla 20 mostramos el resultado del estudio de pacientes con y sin catarata en función de si eran o no Hipertensos, observándose que no hay evidencias estadísticas que nos hagan pensar que el tener o no cataratas pueda estar relacionado con ser o no hipertenso.

Tabla 20: Total de pacientes en función de si eran o no Hipertensos.

		Hipertensión arterial		Total	
		Sí	No		
Catarata	Sí	Recuento	60	41	101
		% de Catarata	59,4%	40,6%	100,0%
		% de Hipertensión arterial	73,2%	66,1%	70,1%
	No	Recuento	22	21	43
		% de Catarata	51,2%	48,8%	100,0%
		% de Hipertensión arterial	26,8%	33,9%	29,9%
Total		Recuento	82	62	144
		% de Catarata	56,9%	43,1%	100,0%
		% de Hipertensión arterial	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,361; OR: 1,397(0,681-2,864)

4.1.5.2. Diabetes Mellitus

El análisis de la incidencia de diabetes mellitus en pacientes con y sin cataratas, mostró que no existen diferencias entre los dos grupos (Tabla 21)

Tabla 21: Total de pacientes en función de si presentaban o no D.M.

		Diabetes Mellitus		Total	
		Sí	No		
Catarata	Sí	Recuento	16	85	101
		% de Catarata	15,8%	84,2%	100,0%
		% de Diabetes Mellitus	59,3%	72,6%	70,1%
	No	Recuento	11	32	43
		% de Catarata	25,6%	74,4%	100,0%
		% de Diabetes Mellitus	40,7%	27,4%	29,9%
Total		Recuento	27	117	144
		% de Catarata	18,8%	81,3%	100,0%
		% de Diabetes Mellitus	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,171; OR: 0,548(0,230-1,305)

4.1.5.3. Hábito Tabáquico

En la Tabla 22 mostramos la distribución de pacientes con y sin catarata en función de si eran o no fumadores, comprobando que no hay evidencias estadísticas que nos sugieran que el desarrollo de cataratas pueda estar relacionado con ser o no fumador.

Tabla 22: Total de pacientes en función de si eran o no Fumadores.

		Fumador		Total
		Sí	No	
Catarata	Recuento	18	83	101
	Sí % de Catarata	17,8%	82,2%	100,0%
	% de Fumador	85,7%	67,5%	70,1%
	Recuento	3	40	43
	No % de Catarata	7,0%	93,0%	100,0%
	% de Fumador	14,3%	32,5%	29,9%
Total	Recuento	21	123	144
	% de Catarata	14,6%	85,4%	100,0%
	% de Fumador	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,092; OR: 2,892(0,805-10,391)

4.1.5.4. Hábito Alcohólico

Como se observa en la Tabla 23 la distribución de la ingesta de alcohol entre pacientes con cataratas y sin cataratas no mostró ninguna asociación de este hábito con el desarrollo de opacificaciones en el cristalino.

Tabla 23: Total de pacientes en función de si eran o no Bebedores Habituales.

		Alcohol		Total
		Sí	No	
Catarata	Recuento	10	91	101
	Sí % de Catarata	9,9%	90,1%	100,0%
	% de Alcohol	100,0%	67,9%	70,1%
	Recuento	0	43	43
	No % de Catarata	,0%	100,0%	100,0%
	% de Alcohol	,0%	32,1%	29,9%
Total	Recuento	10	134	144
	% de Catarata	6,9%	93,1%	100,0%
	% de Alcohol	100,0%	100,0%	100,0%

4.1.5.5. Exposición a luz Ultravioleta

En la Tabla 24 mostramos el resultado del análisis de los pacientes con y sin catarata en función de si habían estado expuestos a radiación ultravioleta o no. Podemos observar que la fracción de personas con cataratas respecto de la de sin cataratas es 2,92 veces mayor en pacientes

que han estado expuestos a rayos ultravioleta que en pacientes no expuestos, y la diferencia es estadísticamente significativa.

Tabla 24: Total de pacientes en función de si habían estado expuestos o no a Radiación U.V.

		Exposición ultravioleta		Total
		Sí	No	
Catarata	Recuento	28	73	101
	Sí % de Catarata	27,7%	72,3%	100,0%
	% de Exposición ultravioleta	84,8%	65,8%	70,1%
	Recuento	5	38	43
	No % de Catarata	11,6%	88,4%	100,0%
	% de Exposición ultravioleta	15,2%	34,2%	29,9%
Total	Recuento	33	111	144
	% de Catarata	22,9%	77,1%	100,0%
	% de Exposición ultravioleta	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,035; OR: 2,915(1,042-8,159)

4.1.5.6. Exposición al Calor Local

Al analizar si la exposición al calor podría influir en el desarrollo de cataratas observamos que no existía ninguna relación entre estos dos fenómenos (Tabla 25).

Tabla 25: Total de pacientes en función de si habían estado expuestos o no a Calor Local.

		Exposición calor		Total	
		Sí	No		
Catarata	Sí	Recuento	9	92	101
		% de Catarata	8,9%	91,1%	100,0%
		% de Exposición calor	81,8%	69,2%	70,1%
	No	Recuento	2	41	43
		% de Catarata	4,7%	95,3%	100,0%
		% de Exposición calor	18,2%	30,8%	29,9%
Total		Recuento	11	133	144
		% de Catarata	7,6%	92,4%	100,0%
		% de Exposición calor	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,378; OR: 2,005(0,415-9,695)

4.2. ESTUDIO GENÉTICO

En la tabla 26 mostramos una valoración global de los resultados obtenidos del estudio genético en función de la presencia de cataratas.

Tabla 26: Pacientes según datos genéticos.

		Catarata			
		Sí		No ¹	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
Glutation-S-transferasa T	Negativo	17	16,8	7	16,7
	Positivo	84	83,2	35	83,3
	Total	101	100,0	42	100,0
Glutation-S-transferasa M	Negativo	56	55,4	21	50,0
	Positivo	45	44,6	21	50,0
	Total	101	100,0	42	100,0
Homocisteína C677T	CC	43	42,6	16	37,2
	TT	17	16,8	10	23,3
	CT	41	40,6	17	39,5
	Total	101	100,0	43	100,0
Homocisteína A1298C	AA	51	50,5	27	62,8
	CC	12	11,9	2	4,7

¹ No se dispone de dato de Glutation-S- transferasa T, ni de Glutation-S- transferasa M de un paciente.

	AC	38	37,6	14	32,6
	Total	101	100,0	43	100,0
Oxido Nítrico Glutámico-Aspártico	Asp	15	14,9	1	2,3
	Glu	45	44,6	16	37,2
	Glu/Asp	41	40,6	26	60,5
	Total	101	100,0	43	100,0
Gen eNos_786TC	CC	14	13,9	4	9,3
	TT	39	38,6	14	32,6
	CT	48	47,5	25	58,1
	Total	101	100,0	43	100,0

En las figuras 23, 24 y 25 mostramos los mismos resultados en diagramas de barras.

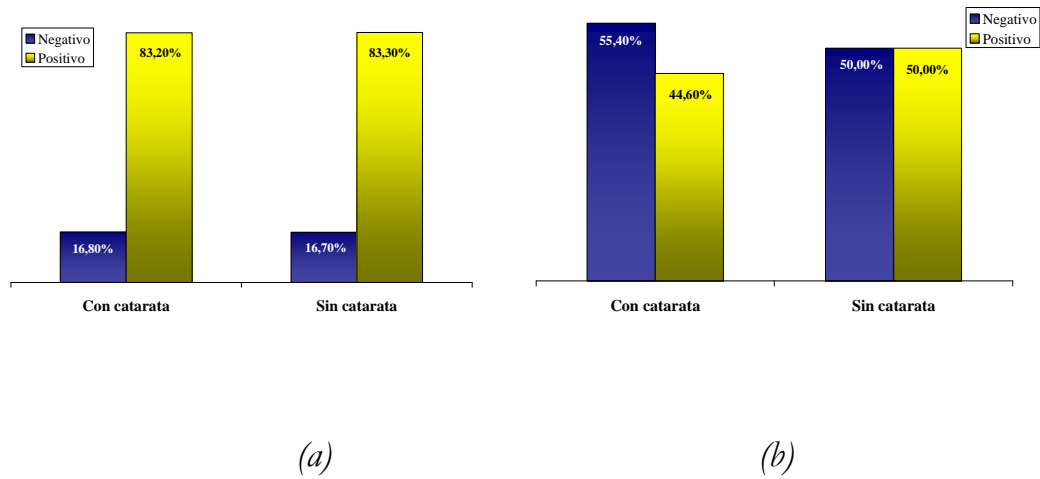


Figura 23: Distribución de pacientes con y sin cataratas según datos genéticos: (a) Glutathion S- Transferasa T y (b) Glutathion S- Transferasa M.

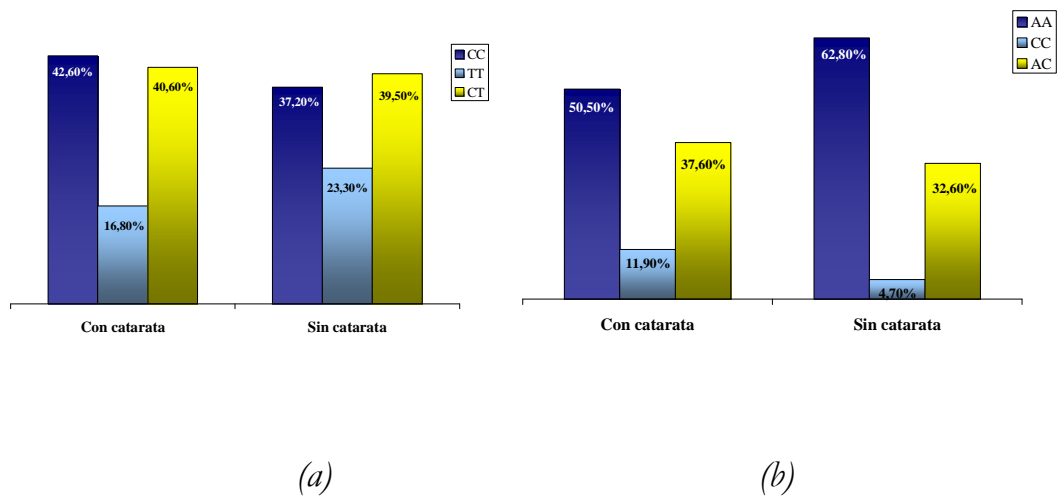


Figura 24: Distribución de pacientes con y sin cataratas según datos genéticos: (a) Homocisteína C677T y (b) Homocisteína A1298C.

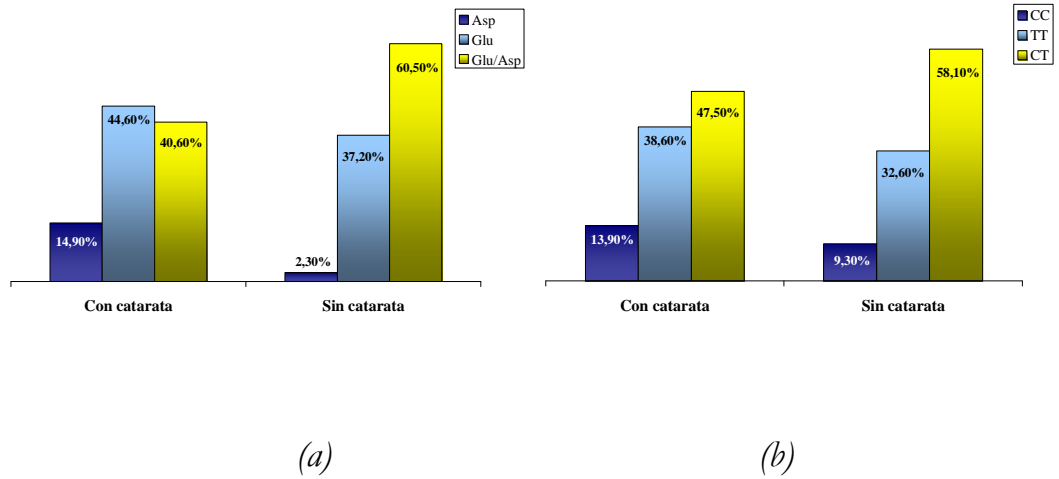


Figura 25: Distribución de pacientes con y sin cataratas según datos genéticos: (a) Óxido Nítrico Glu298Asp y (b) Gen eNos_786TC.

En la tabla 27 se muestran la distribución de genotipos de los genes incluídos en el estudio en función del sexo de los pacientes.

Tabla 27: Datos genéticos de pacientes con cataratas según sexo.

		Sexo			
		Mujer		Hombre	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
Glutation-S-transferasa T	Negativo	8	14,8%	9	19,1%
	Positivo	46	85,2%	38	80,9%
Glutation-S-transferasa M	Negativo	31	57,4%	25	53,2%
	Positivo	23	42,6%	22	46,8%
Homocisteína	CC	24	44,4%	19	40,4%
C677T	TT	11	20,4%	6	12,8%
	CT	19	35,2%	22	46,8%
Homocisteína	AA	28	51,9%	23	48,9%
A1298C	CC	5	9,3%	7	14,9%
	AC	21	38,9%	17	36,2%
Oxido Nítrico Glutámico-Aspártico	Asp	12	22,2%	3	6,4%
	Glu	25	46,3%	20	42,6%
	Glu/Asp	17	31,5%	24	51,1%
Gen eNos_786TC	CC	7	13,0%	7	14,9%
	TT	21	38,9%	18	38,3%
	CT	26	48,1%	22	46,8%

Así mismo analizamos la distribución de genotipos en función de la edad (Tabla 28).

Tabla 28: Datos genéticos de pacientes con cataratas según grupo de edad.

		Edad			
		De 60 a 74 años		De 75 y más años	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
Glutation-S-transferasa T	Negativo	8	14,8%	9	19,1%
	Positivo	46	85,2%	38	80,9%
Glutation-S-transferasa M	Negativo	30	55,6%	26	55,3%
	Positivo	24	44,4%	21	44,7%
Homocisteína	CC	24	44,4%	19	40,4%
C677T	TT	10	18,5%	7	14,9%
	CT	20	37,0%	21	44,7%
Homocisteína	AA	30	55,6%	21	44,7%
A1298C	CC	7	13,0%	5	10,6%
	AC	17	31,5%	21	44,7%
Oxido Nítrico Glutámico-Aspártico	Asp	10	18,5%	5	10,6%
	Glu	20	37,0%	25	53,2%
	Glu/Asp	24	44,4%	17	36,2%
Gen eNos_786TC	CC	9	16,7%	5	10,6%
	TT	22	40,7%	17	36,2%
	CT	23	42,6%	25	53,2%

4.2.1 Glutation-S- Transferasa

4.2.1.1. Glutation-S- transferasa T:

El estudio del gen GSTT1 mostró que no existen diferencias en la distribución de genotipos entre los grupos de pacientes con cataratas y sin cataratas (Tabla 29).

Tabla 29: Pacientes portadores o no del GST-T.

		Glutation-S- transferasa T		Total	
		Negativo	Positivo		
Catarata	Sí	Recuento	17	84	101
		% de Catarata	16,8%	83,2%	100,0%
		% de Glutation-S- transferasa T	70,8%	70,6%	70,6%
	No	Recuento	7	35	42
		% de Catarata	16,7%	83,3%	100,0%
		% de Glutation-S- transferasa T	29,2%	29,4%	29,4%
Total		Recuento	24	119	143
		% de Catarata	16,8%	83,2%	100,0%
		% de Glutation-S- transferasa T	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,981; OR: 1,012(0,386-2,655)

4.2.1.2 Glutation-S- transferasa M:

El análisis de la distribución de genotipos del gen GSTM tampoco reveló la existencia de diferencias entre los grupos de pacientes y controles (Tabla 30).

Tabla 30: Pacientes portadores o no del GST-M.

		Glutation-S- transferasa M		Total	
		Negativo	Positivo		
Catarata	Sí	Recuento	56	45	101
		% de Catarata	55,4%	44,6%	100,0%
		% de Glutation-S- transferasa M	72,7%	68,2%	70,6%
	No	Recuento	21	21	42
		% de Catarata	50,0%	50,0%	100,0%
		% de Glutation-S- transferasa M	27,3%	31,8%	29,4%
Total		Recuento	77	66	143
		% de Catarata	53,8%	46,2%	100,0%
		% de Glutation-S- transferasa M	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,552; OR: 1,244(0,605-2,559)

4.2.2 Metilen-Tetra-Hidro-Folato-Reductasa

4.2.2.1. rs 1801133 (677 C>T)

En la Tabla 31 mostramos el resultado del análisis del polimorfismo 677C>T del gen MTHFR. Como se observa no existen diferencias en la distribución de los genotipos entre los grupos.

Tabla 31: Pacientes homocigotos o heterocigotos para el gen C677T.

		Homocisteína C677T		Total	
		CC+CT	TT		
Catarata	Sí	Recuento	84	17	101
		% de Catarata	83,2%	16,8%	100,0%
		% de Homocisteína C677T	71,8%	63,0%	70,1%
	No	Recuento	33	10	43
		% de Catarata	76,7%	23,3%	100,0%
		% de Homocisteína C677T	28,2%	37,0%	29,9%
Total		Recuento	117	27	144
		% de Catarata	81,3%	18,8%	100,0%
		% de Homocisteína C677T	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,366; OR: 1,497(0,622-3,606)

4.2.2.2. rs 1801131 (1298 A >C)

El estudio del polimorfismo 1298 A>C del gen HMTFR puso de manifiesto la ausencia de relación entre las variantes de este alelo y la susceptibilidad para desarrollar cataratas (Tabla 32).

Tabla 32: Pacientes homocigotos o heterocigotos para el gen A1298C.

		Homocisteína A1298C		Total	
		CC+AC	AA		
Catarata	Sí	Recuento	50	51	101
		% de Catarata	49,5%	50,5%	100,0%
		% de Homocisteína A1298C	75,8%	65,4%	70,1%
	No	Recuento	16	27	43
		% de Catarata	37,2%	62,8%	100,0%
		% de Homocisteína A1298C	24,2%	34,6%	29,9%
Total	Recuento	66	78	144	
	% de Catarata	45,8%	54,2%	100,0%	
	% de Homocisteína A1298C	100,0%	100,0%	100,0%	

P=0,175; OR: 1,654 (0,796-3,437)

4.2.3. Sintetasa de óxido nítrico endotelial (NOS3)

4.2.3.1 rs2070744 (-786TC)

En la Tabla 33 mostramos el resultado del estudio de los genotipos del polimorfismo de la región promotora del gen NOS3 (-786 T>C) en pacientes con y sin cataratas, observando que no existen diferencias en la distribución de los genotipos en función del desarrollo de opacificaciones del cristalino.

Tabla 33: Pacientes homocigotos o heterocigotos para el gen eNos-786TC.

		Gen eNos_786TC		Total	
		CC	TT+CT		
Catarata	Sí	Recuento	14	87	101
		% de Catarata	13,9%	86,1%	100,0%
		% de Gen eNos_786TC	77,8%	69,0%	70,1%
	No	Recuento	4	39	43
		% de Catarata	9,3%	90,7%	100,0%
		% de Gen eNos_786TC	22,2%	31,0%	29,9%
Total		Recuento	18	126	144
		% de Catarata	12,5%	87,5%	100,0%
		% de Gen eNos_786TC	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,449; OR: 1,569(0,485-5,074)

4.2.3.2. *rs* 1799983 (Glu298Asp)

Tras estudiar el polimorfismo de la región codificante del gen NOS3 (Glu298Asp) en pacientes con cataratas y en un grupo de pacientes seleccionados con edades similares sin cataratas, observamos que el alelo

Asp está prácticamente ausente en el grupo de individuos que no desarrollan cataratas en relación con el grupo de pacientes con cataratas donde representan el 15% (Tabla 34).

Tabla 34: Pacientes homocigotos o heterocigotos para el gen Glu/Asp.

		Óxido Nítrico Glutámico-Aspártico		Total	
		Asp	Glu+Glu/ Asp		
Catarata	Sí	Recuento	15	86	101
		% de Catarata	14,9%	85,1%	100,0%
		% de Oxido Nítrico Glutámico-Aspártico	93,8%	67,2%	70,1%
	No	Recuento	1	42	43
		% de Catarata	2,3%	97,7%	100,0%
		% de Oxido Nítrico Glutámico-Aspártico	6,3%	32,8%	29,9%
Total		Recuento	16	128	144
		% de Catarata	11,1%	88,9%	100,0%
		% de Oxido Nítrico Glutámico-Aspártico	100,0%	100,0%	100,0%

P=0,029; O.R.: 7,326(0,936-57,338)

4. DISCUSIÓN

La catarata es actualmente la causa más frecuente de ceguera en el mundo. El desarrollo de la catarata está asociado con el proceso de envejecimiento. Ante el progresivo aumento de la vida media de la población de las sociedades occidentales, esta entidad clínica representa uno de los mayores motivos de consulta oftalmológica, representando la causa más frecuente de cirugía en las personas mayores en los países occidentales.

Aunque la cirugía de la catarata es muy efectiva, la investigación en los factores etiológicos y mecanismos fisiopatológicos implicados en su desarrollo permitirá conocer mejor estos aspectos y prevenir o retrasar el desarrollo de la catarata (Brian and Taylor 2001).

Entre los factores actualmente aceptados como responsables del desarrollo de cataratas están: la edad, el tabaquismo, las radiaciones ultravioletas, la diabetes mellitus y el tratamiento con corticoides (West 2000).

5.1. Estudio clínico

Como observamos en la tabla 2 y en la figura 16, la distribución por sexos fue similar en el grupo de los pacientes intervenidos por cataratas (53%vs. 46%); sin embargo, en el grupo de pacientes sin cataratas

observamos una mayoría de mujeres. El análisis estadístico de estos datos sugiere que, a diferencia de los estudios realizados hasta el momento, en los sujetos incluidos en nuestro estudio, el desarrollo de cataratas es más frecuente en varones que en mujeres.

Así, estudios realizados en población americana (el Beaver Dam Eye Study) (Klein, Klein et al. 1992), francesa (el The POLA Study) (Delcourt, Cristol et al. 2000), italiana (el Casteldaccia Eye Study) (Giuffre, Giammanco et al. 1994) y sueca (el Study in a Swedish Community) (Ostberg, Loth et al. 2006) concluyen que la aparición de cataratas es más frecuente en mujeres.

No obstante, existen estudios en los que se observa que la frecuencia del desarrollo de catarata puede variar dependiendo de la localización de la misma. En población australiana (The Visual Impairment Project) (Mukesh, Le et al. 2006), francesa (The POLA Study) (Delcourt, Cristol et al. 2000) y africana (Congdon, West et al. 2001) se ha descrito que existe mayor frecuencia de catarata cortical en mujeres, mientras que la subcapsular posterior lo es en hombres. En el estudio realizado en población francesa (The POLA Study) se observó que, la mayor frecuencia de opacidad subcapsular posterior en hombres se observa en el grupo de edad menor de 70 años (Delcourt, Cristol et al. 2000).

La mayor incidencia de cataratas en mujeres se ha relacionado con un factor hormonal, pues la menarquia precoz y la menopausia tardía, así como la multiparidad muestran un efecto protector, y la incidencia de catarata nuclear disminuye en mujeres sometidas a terapia hormonal (Congdon, West et al. 2001); (Noran, Salleh et al. 2007). En este sentido, en el Estudio Framingham se comprobó una menor incidencia de catarata nuclear y de subcapsular posterior cuanto mayor tiempo llevaban las mujeres con terapia hormonal sustitutiva (Worzala, Hiller et al. 2001). No obstante, The Blue Mountains Eye Study (Cumming and Mitchell 1997) mostró que el tratamiento con terapia hormonal sustitutiva disminuía la prevalencia de catarata nuclear, no encontrando relación ni con la cortical ni con la subcapsular posterior, aunque este estudio tenía sus limitaciones: era transversal, es decir no había seguimiento en el tiempo y sólo se estudiaba si habían tenido tratamiento con la terapia hormonal sin tener en cuenta ni otros tratamientos ni tratamientos anteriores.

El posible papel protector de la terapia hormonal podría ser debido al efecto antioxidante de los estrógenos. Sin embargo, un estudio realizado en ratas encontró que una combinación de tratamiento con estrógenos y progesterona aumentaba el riesgo de catarata (Lumb, Mitchell et al. 1985).

Además, algunas observaciones indican que puede haber sesgos en la interpretación del papel protector de los estrógenos. Así, en mujeres histerectomizadas precozmente, que han estado años con terapia hormonal, aunque se demuestra que actúa como un factor protector, lo es menos que la menopausia tardía (Klein, Klein et al. 1994). Hay otras variables como fumar, beber, presión arterial sistólica que pueden actuar como factores de confusión y que no son tenidas en cuenta en la mayoría de los estudios. Finalmente, en varios estudios la población elegida que tenía entre 50 y 59 años nacieron en los años de la Gran Depresión Americana (1929-1950) probablemente algo tendrá que ver la alimentación y el estilo de vida de esos años (Klein, Klein et al. 1994).

En nuestro estudio no hemos estratificado ni por edades ni por tipos de cataratas, y la población seleccionada no se ha realizado al azar dentro de la población, sino que hemos seleccionado individuos que acudían al servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, de manera que el grupo de pacientes con cataratas está formado exclusivamente por pacientes que requirieron cirugía y están seleccionados de manera secuencial, mientras que el grupo control está formado por individuos del mismo rango de edad que acudieron por algún otro problema oftalmológico. Probablemente, el sesgo de la selección de

pacientes es suficiente para explicar la discrepancia de nuestros resultados con los previamente reportados.

Esta selección de la muestra también explica que, aunque no existen diferencias significativas en las edades del grupo control y de los pacientes, la edad máxima de los pacientes del grupo control sea de 77 años, mientras que la del grupo de pacientes sea de 91 (tabla 3).

Es conocida la asociación entre alteraciones en genes implicados en metabolismo del hierro, principalmente la ferritina, y el desarrollo de cataratas (Chang-Godinich, Ades et al. 2001); (Dawczynski, Blum et al. 2002) por ello, analizamos el estado del metabolismo del hierro en todos los sujetos incluidos en nuestro estudio. Como se observa en la tabla 5, no hemos encontrado diferencias significativas entre el grupo de pacientes con cataratas y el grupo control. Cuando analizamos los parámetros de metabolismo férrico en pacientes con cataratas de acuerdo con el sexo, se observan unos niveles más bajos, sobre todo de ferritina, en mujeres que en varones (tabla 6), lo que se correlaciona con la historia de pérdidas hemáticas mensuales asociadas con la menstruación.

La determinación de la presión intraocular mostró diferencias entre el grupo de pacientes operados de cataratas y el grupo control, siendo

menor la presión intraocular en el grupo de pacientes intervenidos de cataratas (tablas 9-12). Esta observación puede ser debida a que la selección de pacientes control se realizó entre sujetos que acudían a la consulta de oftalmología por otros motivos, entre los que se incluía la hipertensión ocular. La separación por sexo de los pacientes con cataratas no reveló diferencias entre los grupos.

Por otra parte, nuestro estudio pone claramente de manifiesto que la determinación de la agudeza visual es un parámetro que permite distinguir la presencia de cataratas (tabla 14). No obstante, debemos tener en cuenta que este dato fue uno de los que se tuvo en cuenta a la hora de seleccionar el grupo control. La separación por razón de sexo entre los pacientes muestra una mayor disminución de la agudeza en el grupo de los varones (tabla 15).

En nuestro trabajo hemos analizado si factores de riesgo previamente descritos por otros grupos incidían en el desarrollo de cataratas en nuestros pacientes.

Aunque se ha sugerido que el antecedente de hipertensión favorece el desarrollo de cataratas, no existe un consenso definitivo. Así, en The Barbados Eye Study (Leske, Wu et al. 1999) realizado en pacientes de raza

negra, encuentran relación entre la hipertensión y la opacidad cortical. En un estudio realizado en caucásicos americanos, The Beaver Dam Eye Study (Klein, Klein et al. 2001), aunque no se encuentra relación con la catarata se sugiere que si se realizaran estudios más extensos probablemente sí se encontraría dicha relación; además, las alteraciones encontradas en fondos de ojo con hipertensión se relacionan con mayor incidencia de catarata (Klein, Klein et al. 2004), aunque estas relaciones no son significativas. Sin embargo, otros estudios realizados en caucásicos americanos sí encontraron relación entre hipertensión y cataratas; así, el Allen Park Michigan Veterans Administration Medical Center (Burgess and Sowers 1992), encontró que la hipertensión arterial aumentaba el riesgo de opacificación capsular posterior; en The Physicians Health Study (Schaumberg, Glynn et al. 2001) se observó una relación entre la catarata y la presión arterial sistólica aunque no con la presión arterial diastólica ni con la hipertensión. En un estudio realizado en australianos, The Blue Mountains Eye Study (Tan, Mitchell et al. 2008), se comparó el calibre arterial y venoso y se concluyó que el estrechamiento vascular no es factor de riesgo de catarata sino marcador de riesgo, siendo la edad el factor de riesgo real. Finalmente, en un estudio realizado en franceses, The Pola Study (Delcourt, Cristol et al. 2000), se observó que la hipertensión arterial disminuye el riesgo de extracción del

cristalino, aunque la población utilizada no es representativa de la población general.

En nuestro trabajo, aunque el porcentaje de pacientes con hipertensión arterial fue mayor en pacientes con catarata, también observamos un alto porcentaje de hipertensos en pacientes sin catarata (tabla 20), probablemente debido a que la población incluida en nuestro estudio es mayor de 60 años, y en este rango de edades es más probable ser hipertenso que no serlo.

La separación de los pacientes por sexo o edad tampoco mostró diferencias significativas (tablas 18 y 19).

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento encuentran una clara asociación entre la diabetes y el desarrollo de cataratas. The Blue Mountains Eye Study (Tan, Wang et al. 2008) explica esta relación como consecuencia de un conjunto de alteraciones metabólicas relacionadas con el aumento de resistencia a la insulina. The Beaver Dam Eye Study (Klein, Klein et al. 1985); (Klein, Klein et al. 1998) muestra que la edad es lo que más influye en el desarrollo de catarata, actuando la diabetes como estímulo añadido para la opacidad nuclear y cortical, y en el caso de la opacidad subcapsular posterior actúa acelerando la progresión de una catarata ya

existente, sugiriendo que este proceso está relacionado con el aumento de niveles de Hemoglobina glicosilada. En un estudio realizado en Brasil (Esteves, Dal Pizzol et al. 2008) se observó que la severidad de la retinopatía diabética se asociaba con el desarrollo de cataratas en pacientes con Diabetes Mellitus tipo I. En otro realizado en pacientes coreanos (Kim and Kim 2006), en donde se ha descrito mayor incidencia de diabetes tipo II que en Europa, se ve una mayor incidencia de cataratas que en pacientes sin diabetes, y el desarrollo de cataratas parece relacionado con el tiempo de duración de la diabetes pero no con los niveles de glucosa ni de hemoglobina glicosilada aunque estos resultados son confusos. En The Barbados Eye Study (Leske, Wu et al. 1999) se observó un aumento de la prevalencia de opacidad cortical en pacientes con diabetes, que por otro lado es muy frecuente en personas de raza negra. En The Pola Study (Delcourt, Carriere et al. 2003) también se observó un aumento de la catarata cortical y subcapsular posterior relacionado con el aumento en la duración de la Diabetes Mellitus. Finalmente, en un estudio realizado en Dinamarca (Nielsen and Vinding 1984) que comparaba la incidencia de catarata entre Diabetes tipo I y II, se comprobó que era más frecuente en los pacientes con diabetes tipo II, pero porque generalmente los pacientes con la tipo II son de mayor edad que los de la tipo I, estratificando por edad, no encontraron diferencias entre ambos.

En nuestro trabajo se observa una mayor incidencia de pacientes diabéticos en el grupo control en relación con el grupo de pacientes (tabla 17), aunque sin alcanzar significación estadística (tabla 21). La separación del grupo de pacientes por sexo y edad no aportó diferencias significativas entre los grupos (tablas 18 y 19). Estos resultados probablemente pueden ser debidos a que la población con catarata incluida en nuestro estudio presenta el sesgo de que son pacientes intervenidos, por lo que excluimos a los pacientes diabéticos mayores con otras patologías añadidas que los excluyen de la intervención quirúrgica, mientras que el grupo control está seleccionado de pacientes que acuden a consulta sin cataratas entre los que pueden encontrarse diabéticos en estadios iniciales a los que se realiza estudio de fondo de ojo para controlar su posible retinopatía. Por otra parte, dado el tamaño de la muestra no hemos diferenciado sujetos con diabetes tipo I o II.

En diferentes estudios se han mostrado la asociación entre el hábito tabáquico y el desarrollo de cataratas. The Beaver Dam Eye Study (Klein, Klein et al. 1993) mostró un aumento del riesgo de opacidad nuclear y subcapsular posterior en fumadores respecto de no fumadores. En un estudio realizado en Maryland (West, Munoz et al. 1989) se observó la relación entre la catarata y el tabaco, encontrando relación dosis acumulativa de manera que cuanto mayor era la cantidad fumada, mayor era

la incidencia de catarata y, al dejar de fumar, cuantos más años pasaban desde que se dejaba de fumar más se iba igualando la incidencia a la del grupo de no fumadores, aunque nunca se llega a igualar. En los estudios Framingham I (1973-1975) y II (1986-1989) (Hiller, Sperduto et al. 1997) se encontró una relación significativa entre fumar (duración y cantidad) y opacidad nuclear; no así con las corticales ni subcapsulares posteriores. En los estudios The Pola Study (Delcourt, Cristol et al. 2000) y AREDS (Age Related Eye Disease Study) (2001) se observó un aumento de la frecuencia de catarata nuclear en pacientes fumadores, pero está en el límite de significación, y se relacionó el aumento del riesgo con el aumento de estrés oxidativo, la disminución de antioxidantes, y el aumento de los niveles de cadmio que se produce en fumadores. En el estudio del Physician's Health Study (Christen, Glynn et al. 2000) se observó que el dejar de fumar tenía efectos beneficiosos, entre ellos la disminución de la incidencia de catarata, y se comprobó que el riesgo en exfumadores era intermedio entre el riesgo en fumadores y en no fumadores. Sin embargo, en The City Eye Study (Flay, Sullivan et al. 1989) no se observó una disminución del riesgo de opacidad nuclear en grandes fumadores que han dejado de fumar en comparación con los que siguen fumando. Resultados similares se obtuvieron en The Nurses' Health Study (Weintraub, Willett et al. 2002)

aunque en este estudio se comprobó que el riesgo de desarrollar cataratas se equilibra con la población no fumadora a los 10 años de dejar de fumar.

En nuestro estudio no hemos encontrado una mayor incidencia de fumadores en el grupo de pacientes con cataratas (tabla 22), aunque la incidencia de fumadores en los dos grupos es menor que la descrita en población española. Además, llama la atención que ninguna de las mujeres incluídas en nuestro estudio tuviesen hábito tabáquico (tabla 18), lo que probablemente está relacionado con la edad de selección de pacientes y controles y los hábitos sociales de nuestro país.

Hasta el momento existen estudios con resultados contradictorios que abordan la relación entre el consumo de alcohol y el desarrollo de cataratas. En un estudio realizado en mujeres suecas (Lindblad, Hakansson et al. 2007) se comprobó un aumento de la frecuencia de cataratas en pacientes consumidores habituales de alcohol; sin embargo en un estudio en enfermeras realizado en EEUU (Chasan-Taber, Willett et al. 2000) no se encontró ninguna asociación; y en The Nurses' Health Study Cohort (Morris, Jacques et al. 2004) se observó un aumento del riesgo de opacidades nucleares en consumidores de licores y vino, mayor cuanto mayor era la cantidad que se consumía; sin embargo también se observó una disminución de opacidades corticales en consumidores de vino.

Nosotros no podemos extraer ninguna conclusión dado que ninguno de los controles incluidos en el estudio refería ser consumidor habitual de alcohol (tabla 23), lo que contrasta con los hábitos de la población española. En este sentido debemos señalar que el criterio de consumo de alcohol se refería a pacientes alcohólicos y no a pacientes con un consumo moderado de alcohol.

Aunque existen evidencias experimentales que asocian el desarrollo de cataratas con la exposición a luz U.V.(Taylor, West et al. 1988); (Hayashi, Hayashi et al. 2003); (West, Longstreth et al. 2005), existen discrepancias en la relación entre exposición a la luz U.V. y el desarrollo de cataratas en humanos. En un estudio en el que se incluían pacientes con cataratas corticales (Sasaki, Kawakami et al. 2003) se observó que la prevalencia era mayor en el cuadrante nasal inferior, y mayor en los más expuestos. En otro estudio comparativo entre dos poblaciones del norte de Pakistán (Burton, Fergusson et al. 1997) se concluyó que la exposición a U.V. era factor de riesgo añadido, no el único para producir catarata. En The Beaver Dam Eye Study (Cruickshanks, Klein et al. 1992) también se observó esta relación con la catarata cortical, no con la nuclear ni con la subcapsular posterior. Sin embargo, en un estudio realizado por la Agencia Americana de Higiene Ambiental (Sliney 1994) no constataron esta relación más que experimentalmente, y en un estudio más reciente, realizado en

nuestro país (Pastor-Valero, Fletcher et al. 2007) se encuentra esta relación entre la exposición a los U.V. y el desarrollo de cataratas.

Como se muestra en la tabla 24, nosotros encontramos una mayor exposición a la luz ultravioleta en el grupo de pacientes intervenidos por cataratas en relación con el grupo control. Al no haber recogido datos de los aspectos profesionales de los sujetos en estudio, no podemos señalar cuál es la causa de estas diferencias, aunque podemos especular con que puede ser debido a que la población seleccionada en ese rango de edad en nuestra provincia tiene un alto porcentaje de trabajo en el campo.

Existen pocos estudios que analicen específicamente la influencia del calor local en relación con el desarrollo de cataratas. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han llevado a cabo en animales de experimentación. El estudio del efecto del aumento de la temperatura en el cristalino produce cataratogénesis por glicosilación y carbamilación de las proteínas de la lente pero este efecto no es sólo debido al aumento de la temperatura sino también debido al efecto de la exposición U.V. (Al-Ghadyan and Cotlier 1986). Parece también que el aumento acelera el metabolismo y disminuye la elasticidad; en otro se estudiaba la formación de cataratas térmicas en conejos (Kramar, Harris et al. 1987), producidos en microondas debidas al aumento de temperatura; en humanos se realizó un

estudio (Pokhrel, Smith et al. 2005) comparando la formación de cataratas en cocineros de cocinas con combustibles sólidos y en cocineros de cocinas de combustibles líquidos siendo mayor la prevalencia de catarata en los primeros. Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en relación con la exposición al calor (tabla 25).

5.2. Estudio genético

Como ya hemos señalado anteriormente, aunque la edad es el factor más importante asociado al desarrollo de cataratas, los factores genéticos tienen un importante efecto en la patogénesis de las mismas (Hejtmancik and Kantorow 2004).

Actualmente se cree que los mecanismos oxidativos desempeñan un papel muy importante en la patogénesis de la catarata senil. Los radicales libres inician la peroxidación lipídica induciendo la formación de peróxidos en diferentes tipos de cataratas (Babizhayev and Costa 1994). En este sentido, los mecanismos celulares que disminuyen las manifestaciones tóxicas del daño oxidativo desempeñan un papel importante en la protección frente al desarrollo de cataratas (Giblin 2000), y la formación de proteínas-tiol podría representar un daño prematuro de la lente durante el desarrollo de cataratas seniles al desencadenar una cascada de sucesos que

inducirían la inactivación de determinados enzimas, la alteración en la conformación protéica y la agregación de proteínas que finalizaría con la opacificación de la lente (Raghavachari, Qiao et al. 1999).

Las glutatión transferasas (GSTs) son un grupo de enzimas implicados en sistemas de “limpieza” celular, entre ellos en las células del cristalino, que catalizan la reacción de conjugación entre el glutatión reducido (GSH) y una gran variedad de compuestos electrofílicos. Las GSTs se clasifican de acuerdo con su punto isoeléctrico, su especificidad de sustrato y su secuencia aminoacídica.

Nosotros hemos estudiado los genes GSTM y GSTT que presentan variantes polimorfas definidas por la presencia o ausencia de los enzimas. Como mostramos en las tablas 29 y 30, la comparación de la distribución de las variantes genotípicas de estos genes no se asocia con la presencia o ausencia de cataratas.

Hasta el momento son escasos los trabajos que han analizado esta posible asociación. Se ha señalado que la pérdida de GSTT puede asociarse con la formación de cataratas en pacientes japoneses (Sekine, Hommura et al. 1995) y que la delección de GSTM puede relacionarse con el desarrollo de cataratas en pacientes estonios (Juronen, Tasa et al. 2000). Estas

discrepancias sugieren que son necesarios más estudios en poblaciones más amplias antes de poder extraer conclusiones definitivas.

Varios estudios han demostrado que la administración de folatos protege frente al desarrollo de cataratas (Kuzniarz, Mitchell et al. 2001). El folato de la dieta se convierte, por acción de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), en 5 metiltetrahidrofolato que interviene en la remetilación de homocisteína a metionina.

El gen que codifica MTHFR tiene dos polimorfismos 677C>T y 1298 A>C que se asocian con una disminución de la actividad de la enzima y con hiperhomocisteinemia y se han asociado con enfermedades oftalmológicas como neuropatía óptica y el glaucoma de ángulo abierto (Bleich, Junemann et al. 2002).

Nosotros hemos estudiado los dos polimorfismos en una población de pacientes intervenidos de cataratas y un grupo control de la misma edad y no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas (tablas 31 y 32). Hasta el momento sólo existe un trabajo previo en el que se analiza esta posible relación y en el que se encuentran resultados similares a los nuestros (Zetterberg, Tasa et al. 2005), por lo que no parece que, aunque los folatos puedan ejercer un papel protector frente al desarrollo de cataratas, esta protección sea mediada por el gen MTHFR.

Estudios recientes han mostrado que el óxido nítrico (NO) puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de cataratas (Paik and Dillon 2000) y la administración de aminoguanidina, un inhibidor de la producción de NO suprime el desarrollo de cataratas en estudios realizados en animales (Inomata, Hayashi et al. 2000).

Se han descrito hasta el momento tres isoformas de la proteína NOS: la NOS endotelial (eNOS o NOS3); la NOS inducible (iNOS o NOS2) y la NOS neuronal (nNOS o NOS1). La eNOS y la nNOS son las isoformas constitutivas y su activación es dependiente de calcio, mientras que la iNOS es independiente de los niveles de calcio y se sintetiza como respuesta a la activación de la reacción inmune (Albina and Reichner 1995). Las alteraciones en la expresión o en la actividad de las enzimas NOS influyen directamente en la producción de NO.

El gen que codifica la eNOS humana (NOS3) se localiza en el cromosoma 7q35-36. Este gen consta de 26 exones y 25 intrones que ocupan 20,78Kb y se transcriben en un mRNA de 3690pb que codifica una proteína de 133,2kDa. Desde su caracterización en 1990 se han identificado varios polimorfismos (Albrecht, Stegeman et al. 2003) entre los que destacan, por ser los más frecuentes, el -786T>C de la región promotora del gen y el G894T localizado en el exón 7.

El polimorfismo -786T>C de la región promotora del gen NOS3 puede alterar su transcripción y modificar los niveles de la enzima (Nakayama, Yasue et al. 2000). Algunos estudios previos demuestran que esta sustitución produce una disminución del 50% en la transcripción de la enzima de modo que los individuos portadores del alelo -786C presentan una reducción en los niveles de expresión de la eNOS. Este polimorfismo se ha asociado con una mayor susceptibilidad a desarrollar algunas enfermedades como el infarto de miocardio, la diabetes o la hipertensión (Kajiyama, Saito et al. 2000); (Zanchi, Moczulski et al. 2000); (Tsujita, Baba et al. 2001).

El polimorfismo G894T del gen NOS3, produce un cambio Glu298Asp en la proteína. Algunos estudios recientes muestran que la proteína eNOS que presenta el aminoácido Asp en la posición 298 sufre una metabolización más rápida que aquella que en su lugar presenta el aminoácido Glu (Tesauro, Thompson et al. 2000) y, además, se producen cambios en la estructura primaria de la proteína que podrían alterar la funcionalidad de la enzima (Stasiv, Kuzin et al. 2004). La eNOS necesita dimerizar consigo misma para ejercer su actividad catalítica, por lo tanto, estas variaciones genéticas que producen cambios en la proteína pueden alterar la formación de estos homodímeros y modificar la actividad de la enzima.

El análisis de los datos de nuestro estudio muestra que ser portador homocigoto del alelo Asp en el gen NOS3 se asocia con una mayor predisposición a desarrollar cataratas (tabla 34). Como hemos señalado, ser portador de este alelo parece que se asocia con una metabolización más rápida de la enzima, lo que podría disminuir los niveles de óxido nítrico y alterar los niveles de vascularización del cristalino.

En resumen, nuestro trabajo pone de manifiesto la ausencia de relación del desarrollo de cataratas con los polimorfismo más frecuentes en los genes GSTM, GSTT y MTHFR pero, por primera vez mostramos una asociación con una variante alélicas del gen NOS3, sugiriendo que variantes de este gen podrían actuar como genes que modulan la susceptibilidad a desarrollar cataratas, siendo necesario replicar estos resultados en otras poblaciones para confirmarlos.

6. CONCLUSIONES

1. En nuestra población la agudeza visual es la variable con más sensibilidad y especificidad para discriminar pacientes con catarata.

2. Entre los parámetros bioquímicos analizados, solo los niveles de transferrina y la capacidad de saturación son significativamente menores en pacientes con catarata, lo que sugiere que desequilibrios en el metabolismo férrico podrían estar asociados con el desarrollo de cataratas.

3. Enfermedades multifactoriales como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, el tabaquismo o el alcoholismo no son factores de riesgo significativos en el desarrollo de la catarata senil en nuestra población.

4. La exposición a la radiación ultravioleta influye de forma significativa en el desarrollo de la catarata senil y constituye el factor de riesgo externo más importante.

5. No hemos encontrado relación entre los distintos polimorfismos estudiados del gen de la glutatión transferasa con la opacificación cristaliniiana senil.

6. Así mismo, los polimorfismos estudiados referentes al gen de la metilentetrahidrofolato reductasa, no han mostrado estar asociados con el desarrollo de la catarata senil.

7. Nuestro trabajo muestra por primera vez que el desarrollo de cataratas puede estar asociado con variantes genéticas en el gen NOS3, que codifica la enzima sintetasa endotelial de óxido nítrico, de manera que los portadores del alelo Asp en posición 298 presentan mayor susceptibilidad para el desarrollo de la misma.

7. BIBLIOGRAFÍA

(1994). "Familial aggregation of lens opacities: the Framingham Eye Study and the Framingham Offspring Eye Study." Am J Epidemiol 140(6): 555-64.

(2001). "The age-related eye disease study (AREDS) system for classifying cataracts from photographs: AREDS report no. 4." Am J Ophthalmol 131(2): 167-75.

(2001). "Risk factors associated with age-related nuclear and cortical cataract : a case-control study in the Age-Related Eye Disease Study, AREDS Report No. 5." Ophthalmology 108(8): 1400-8.

Abraham, A. G., N. G. Condon, et al. (2006). "The new epidemiology of cataract." Ophthalmol Clin North Am 19(4): 415-25.

Acosta, R., L. Hoffmeister, et al. (2006). "Systematic review of population-based studies of the prevalence of cataracts." Arch Soc Esp Oftalmol 81(9): 509-16.

Al-Ghadyan, A. A. and E. Cotlier (1986). "Rise in lens temperature on exposure to sunlight or high ambient temperature." Br J Ophthalmol 70(6): 421-6.

Alberti, G., M. Oguni, et al. (1996). "Glutathione S-transferase M1 genotype and age-related cataracts. Lack of association in an Italian population." Invest Ophthalmol Vis Sci 37(6): 1167-73.

Albina, J. E. and J. S. Reichner (1995). "Nitric oxide in inflammation and immunity." New Horiz 3(1): 46-64.

Albrecht, E. W., C. A. Stegeman, et al. (2003). "Protective role of endothelial nitric oxide synthase." J Pathol 199(1): 8-17.

Alcala, J., R. J. Cenedella, et al. (1985). "Limited proteolysis of MP26 in lens fiber plasma membranes of the U18666A-induced cataract in rats." Curr Eye Res 4(9): 1001-5.

Allen, D. (2008). "Cataract." Clin Evid (Online) 2008.

Ambrosone, C. B., J. L. Freudenheim, et al. (1995). "Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk." Cancer Res 55(16): 3483-5.

Arngrimsson, R., C. Hayward, et al. (1997). "Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region." Am J Hum Genet 61(2): 354-62.

Atreya, P. L., J. Barnes, et al. (1989). "N-cadherin of the human lens." Curr Eye Res 8(9): 947-56.

Babizhayev, M. A. and E. B. Costa (1994). "Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens." Biochim Biophys Acta 1225(3): 326-37.

Bagley, P. J. and J. Selhub (1998). "A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells." Proc Natl Acad Sci U S A 95(22): 13217-20.

Bailey, L. B. (2003). "Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C-->T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations." J Nutr 133(11 Suppl 1): 3748S-3753S.

Bailey, L. B. and J. F. Gregory, 3rd (1999). "Folate metabolism and requirements." J Nutr 129(4): 779-82.

Barraquer R.I. Y Tsiplakos F.; Clasificación de las cataratas. La hidrofacoemulsificación mediante el sistema Aqualase: una nueva alternativa en cirugía del cristalino. Ed: Anales del Instituto Barraquer, Barcelona 2007.

Bauer, J. A. and H. L. Fung (1994). "Photochemical generation of nitric oxide from nitro-containing compounds: possible relation to vascular photorelaxation phenomena." Life Sci 54(1): PL1-4.

Benedetti, P. C., B. Tagliamonte, et al. (1981). "Evaluation of protein quality: comparison of single-point and multi-point assays." Ann Nutr Metab 25(1): 48-58.

Benito, E., E. Cabeza, et al. (1993). "Diet and colorectal adenomas: a case-control study in Majorca." Int J Cancer 55(2): 213-9.

Bettelheim, F. A. and L. T. Chylack, Jr. (1985). "Light scattering of whole excised human cataractous lenses. Relationships between different light scattering parameters." Exp Eye Res 41(1): 19-30.

Bhat, S. P. and C. N. Nagineni (1989). "alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues." Biochem Biophys Res Commun 158(1): 319-25.

Bleich, S., A. Junemann, et al. (2002). "Homocysteine and risk of open-angle glaucoma." J Neural Transm 109(12): 1499-504.

Blom, H. J. (1998). "Determinants of plasma homocysteine." Am J Clin Nutr 67(2): 188-9.

Blount, B. C., M. M. Mack, et al. (1997). "Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage." Proc Natl Acad Sci U S A 94(7): 3290-5.

Blundell, T., P. Lindley, et al. (1981). "The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II." Nature 289(5800): 771-7.

Borchman, D., F. J. Giblin, et al. (2000). "Impact of aging and hyperbaric oxygen in vivo on guinea pig lens lipids and nuclear light scatter." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(10): 3061-73.

Boulanger, C. M. (1995). "[Endothelial NO synthase]." C R Seances Soc Biol Fil 189(6): 1069-79.

Botto, L. D. and Q. Yang (2000). "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review." Am J Epidemiol 151(9): 862-77

Brady, J. P., D. Garland, et al. (1997). "Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin." Proc Natl Acad Sci U S A 94(3): 884-9.

Branda, R. F. and D. B. Blickensderfer (1993). "Folate deficiency increases genetic damage caused by alkylating agents and gamma-irradiation in Chinese hamster ovary cells." Cancer Res 53(22): 5401-8.

Brian, G. and H. Taylor (2001). "Cataract blindness--challenges for the 21st century." Bull World Health Organ 79(3): 249-56.

Burgess, C. A. and M. Sowers (1992). "Systemic hypertension and senile cataracts: an epidemiologic study." Optom Vis Sci 69(4): 320-4.

Burton, M., E. Fergusson, et al. (1997). "The prevalence of cataract in two villages of northern Pakistan with different levels of ultraviolet radiation." Eye 11 (Pt 1): 95-101.

Butler, P. A. (1994). "Reversible cataracts in diabetes mellitus." J Am Optom Assoc 65(8): 559-63.

Butterworth, C. E., Jr., R. Santini, Jr., et al. (1963). "The Pteroylglutamate Components of American Diets as Determined by Chromatographic Fractionation." J Clin Invest 42: 1929-39.

Carnahan, M. C. and D. A. Goldstein (2000). "Ocular complications of topical, peri-ocular, and systemic corticosteroids." Curr Opin Ophthalmol 11(6): 478-83.

Carter, J. M., A. M. Hutcheson, et al. (1995). "In vitro studies on the assembly properties of the lens proteins CP49, CP115: coassembly with alpha-crystallin but not with vimentin." Exp Eye Res 60(2): 181-92.

Cekic, O. (1998). "Effect of cigarette smoking on copper, lead, and cadmium accumulation in human lens." Br J Ophthalmol 82(2): 186-8.

Clayton, R. M., J. Cuthbert, et al. (1980). "Analysis of individual cataract patients and their lenses: a progress report." Exp Eye Res 31(5): 553-66.

Congdon, N., S. K. West, et al. (2001). "Prevalence of the different types of age-related cataract in an African population." Invest Ophthalmol Vis Sci 42(11): 2478-82.

Cruickshanks, K. J., B. E. Klein, et al. (1992). "Ultraviolet light exposure and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study." Am J Public Health 82(12): 1658-62.

Cruz-González, I., González-Sarmiento, R., et al. (2009). "Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study." BMC Cardiovascular Disord (9): 35.

Cruz-González, I., González-Sarmiento, R., et al. (2009). "An association between resistant hypertension and the null GSTM1 genotype." J Hum Hypertens 23(8): 556-8

Cumming, R. G. and P. Mitchell (1997). "Hormone replacement therapy, reproductive factors, and cataract. The Blue Mountains Eye Study." Am J Epidemiol 145(3): 242-9.

Cumming, R. G. and P. Mitchell (1998). "Medications and cataract. The Blue Mountains Eye Study." Ophthalmology 105(9): 1751-8.

Cumming, R. G., P. Mitchell, et al. (1997). "Use of inhaled corticosteroids and the risk of cataracts." N Engl J Med 337(1): 8-14.

Cuzzocrea, S., B. Zingarelli, et al. (1997). "Role of peroxynitrite and activation of poly (ADP-ribose) synthase in the vascular failure induced by zymosan-activated plasma." Br J Pharmacol 122(3): 493-503.

Cvekl, A. and M. K. Duncan (2007). "Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development." Prog Retin Eye Res 26(6): 555-97.

Cvekl, A. and J. Piatigorsky (1996). "Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6." Bioessays 18(8): 621-30.

Cvekl, A., Y. Yang, et al. (2004). "Regulation of gene expression by Pax6 in ocular cells: a case of tissue-preferred expression of crystallins in lens." Int J Dev Biol 48(8-9): 829-44.

Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev 59(3): 527-605.

Chang-Godinich, A., S. Ades, et al. (2001). "Lens changes in hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome." Am J Ophthalmol 132(5): 786-8.

Chasan-Taber, L., W. C. Willett, et al. (2000). "A prospective study of alcohol consumption and cataract extraction among U.S. women." Ann Epidemiol 10(6): 347-53.

Chatterjee, A. and J. D. Catravas (2008). "Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation." Vascul Pharmacol 49(4-6): 134-40.

Cheng, A. C., C. P. Pang, et al. (2000). "The association between cigarette smoking and ocular diseases." Hong Kong Med J 6(2): 195-202.

Cheng, C. Y., J. H. Liu, et al. (2000). "Population-based study on prevalence and risk factors of age-related cataracts in Peitou, Taiwan." Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei) 63(8): 641-8.

Chepelinsky, A. B., J. Piatigorsky, et al. (1991). "Lens protein gene expression: alpha-crystallins and MIP." Lens Eye Toxic Res 8(2-3): 319-44.

Chow, R. L. and R. A. Lang (2001). "Early eye development in vertebrates." Annu Rev Cell Dev Biol 17: 255-96.

Christen, W. G., R. J. Glynn, et al. (2000). "Smoking cessation and risk of age-related cataract in men." JAMA 284(6): 713-6.

Church, R. L., J. H. Wang, et al. (1995). "The human lens intrinsic membrane protein MP70 (Cx50) gene: clonal analysis and chromosome mapping." Curr Eye Res 14(3): 215-21.

Chylack, L. T., Jr., J. K. Wolfe, et al. (1993). "The Lens Opacities Classification System III. The Longitudinal Study of Cataract Study Group." Arch Ophthalmol 111(6): 831-6.

Datiles, M. B., 3rd, B. V. Magno, et al. (1995). "Study of nuclear cataract progression using the National Eye Institute Scheimpflug system." Br J Ophthalmol 79(6): 527-34.

Datiles Manuel B. and Benjamin V.M.; Cataract: Clinical types. In: Duane's: Clinical Ophthalmology.

Daubner, S. C. and R. G. Matthews (1982). "Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver." J Biol Chem 257(1): 140-5.

Dawczynski, J., M. Blum, et al. (2002). "Increased content of zinc and iron in human cataractous lenses." Biol Trace Elem Res 90(1-3): 15-23.

DeBlack, S. S. (2003). "Cigarette smoking as a risk factor for cataract and age-related macular degeneration: a review of the literature." Optometry 74(2): 99-110.

Delcourt, C., I. Carriere, et al. (2003). "Associations of cataract with antioxidant enzymes and other risk factors: the French Age-Related Eye Diseases (POLA) Prospective Study." Ophthalmology 110(12): 2318-26.

Delcourt, C., J. P. Cristol, et al. (2000). "Risk factors for cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts: the POLA study. Pathologies Oculaires Liees a l'Age." Am J Epidemiol 151(5): 497-504.

Dickerson, J. E., Jr. and M. F. Lou (1997). "Free cysteine levels in normal human lenses." Exp Eye Res 65(3): 451-4.

Dirks, R. P., S. T. Van Genesen, et al. (1998). "Extralenticular expression of the rodent betaB2-crystallin gene." Exp Eye Res 66(2): 267-9.

Donner, A. L., F. Ko, et al. (2007). "Pax6 is misexpressed in Sox1 null lens fiber cells." Gene Expr Patterns 7(5): 606-13.

Driessen, H. P., P. Herbrink, et al. (1981). "Primary structure of the bovine beta-crystallin Bp chain. Internal duplication and homology with gamma-crystallin." Eur J Biochem 121(1): 83-91.

Dubin, R. A., E. F. Wawrousek, et al. (1989). "Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens." Mol Cell Biol 9(3): 1083-91.

Engbersen, A. M., D. G. Franken, et al. (1995). "Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia." Am J Hum Genet 56(1): 142-50.

Esteves, J. F., M. M. Dal Pizzol, et al. (2008). "Cataract and type 1 diabetes mellitus." Diabetes Res Clin Pract 82(3): 324-8.

Flaye, D. E., K. N. Sullivan, et al. (1989). "Cataracts and cigarette smoking. The City Eye Study." Eye 3 (Pt 4): 379-84.

Fodinger, M., H. Buchmayer, et al. (2000). "Effect of MTHFR 1298A-->C and MTHFR 677C-->T genotypes on total homocysteine, folate, and

vitamin B(12) plasma concentrations in kidney graft recipients." J Am Soc Nephrol 11(10): 1918-25.

Freudenheim, J. L., S. Graham, et al. (1991). "Folate intake and carcinogenesis of the colon and rectum." Int J Epidemiol 20(2): 368-74.

Fris, M., J. Cejkova, et al. (2008). "The effect of single and repeated UVB radiation on rabbit lens." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 246(4): 551-8.

Friso, S., S. W. Choi, et al. (2002). "A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status." Proc Natl Acad Sci U S A 99(8): 5606-11.

Frosst, P., H. J. Blom, et al. (1995). "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase." Nat Genet 10(1): 111-3.

Garcia-Castineiras, S., J. Dillon, et al. (1978). "Non-tryptophan fluorescence associated with human lens protein; apparent complexity and isolation of bityrosine and anthranilic acid." Exp Eye Res 26(4): 461-76.

Garland, D. L., Y. Douglas-Tabor, et al. (1996). "The nucleus of the human lens: demonstration of a highly characteristic protein pattern by two-dimensional electrophoresis and introduction of a new method of lens dissection." Exp Eye Res 62(3): 285-91.

Gasparovic, J., K. Raslova, et al. (2004). "Effect of C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on plasma homocysteine levels in ethnic groups." Physiol Res 53(2): 215-8.

Gerhard, D. S., L. T. Nguyen, et al. (2003). "A relationship between methylenetetrahydrofolate reductase variants and the development of invasive cervical cancer." Gynecol Oncol 90(3): 560-5.

Giblin, F. J. (2000). "Glutathione: a vital lens antioxidant." J Ocul Pharmacol Ther 16(2): 121-35.

Gil del Río, E.; Agudeza Visual. En: E. Gil del Río; Óptica Fisiológica; Ed: Toray. Quinta Edición, Barcelona 1984.

Giuffre, G., R. Giammanco, et al. (1994). "Casteldaccia eye study: prevalence of cataract in the adult and elderly population of a Mediterranean town." Int Ophthalmol 18(6): 363-71.

Glasser, A. and M. C. Campbell (1998). "Presbyopia and the optical changes in the human crystalline lens with age." Vision Res 38(2): 209-29.

Glasser, A. and M. C. Campbell (1999). "Biometric, optical and physical changes in the isolated human crystalline lens with age in relation to presbyopia." Vision Res 39(11): 1991-2015.

Glynn, R. J., W. G. Christen, et al. (1995). "Body mass index. An independent predictor of cataract." Arch Ophthalmol 113(9): 1131-7.

Gomma, A. H., M. A. Elrayess, et al. (2002). "The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis." Eur Heart J 23(24): 1955-62.

Gorin, M. B., S. B. Yancey, et al. (1984). "The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning." Cell 39(1): 49-59.

Goulielmos, G., G. Kiliass, et al. (1986). "Adaptation of Drosophila enzymes to temperature--V. Heat shock effect on the malate dehydrogenase of Drosophila melanogaster." Comp Biochem Physiol B 85(1): 229-34.

Goyette, P., J. S. Sumner, et al. (1994). "Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification." Nat Genet 7(4): 551.

Gruijters, W. T., J. Kistler, et al. (1987). "Immunolocalization of MP70 in lens fiber 16-17-nm intercellular junctions." J Cell Biol 104(3): 565-72.

Guarnieri, A., Hernández-Galilea, E., et al. (2009). "TLX2 protein is expressed in the mouse lens during embryonic development." Invest Ophthalmol Vis Sci 50. E. Abstract 4366.

Gudnason, V., D. Stansbie, et al. (1998). "C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group." Atherosclerosis 136(2): 347-54.

Guttormsen A.B., Schneede J., et al. (1996). "Kinetics of total plasma homocysteine in subjects with hyperhomocysteinemia due to folate or cobalamin deficiency". Am J Clin Nutr.;63(2):194-202

Güven, M., M. Unal, et al. (2007). "Glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and the risk of cataract development: a study in the Turkish population." Curr Eye Res 32(5): 447-54.

Hains, P. G. and R. J. Truscott (2007). "Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses." J Proteome Res 6(10): 3935-43.

Halliwell, B. (1989). "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." Br J Exp Pathol 70(6): 737-57.

Hammond, C. J., H. Snieder, et al. (2000). "Genetic and environmental factors in age-related nuclear cataracts in monozygotic and dizygotic twins." N Engl J Med 342(24): 1786-90.

Hao, L. N., Y. L. Ling, et al. (2004). "[Peroxynitrite-induced formation of diabetic cataract and its prevention by puerarin in rat]." Zhonghua Yan Ke Za Zhi 40(5): 311-6.

Harding, C. V., J. R. Reddan, et al. (1971). "The control of cell division in the ocular lens." Int Rev Cytol 31: 215-300.

Harding, J. J. (1994). "The untenability of the sunlight hypothesis of cataractogenesis." Doc Ophthalmol 88(3-4): 345-9.

Harding J.; Human Cataract. In: Harding J.; Biochemistry, epidemiology and pharmacology. Ed: Chapman & Hall, London 1991.

Harding J.J. AND CRABE MJC.; The Lens: Development, proteins metabolism and cataract. In: Davson H.: Vegetative physiology and biochemistry; Ed: Academic Press. Third Edition, London 1984.

Harding J.J.; The Untenability of the Sunlight Hipotesis of the Cataractogenesis; Ed: Documenta Ophthalmologica, London 1995.

Harrington, V., O. P. Srivastava, et al. (2007). "Proteomic analysis of water insoluble proteins from normal and cataractous human lenses." Mol Vis 13: 1680-94.

Hattenbach, L. O., A. Allers, et al. (2000). "L-Arginine-nitric oxide pathway-related metabolites in the aqueous humor of diabetic patients." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(1): 213-7.

Hayashi, L. C., S. Hayashi, et al. (2003). "Ultraviolet B exposure and type of lens opacity in ophthalmic patients in Japan." Sci Total Environ 302(1-3): 53-62.

Hefler, L., S. Jirecek, et al. (2004). "Genetic polymorphisms associated with thrombophilia and vascular disease in women with unexplained late intrauterine fetal death: a multicenter study." J Soc Gynecol Investig 11(1): 42-4.

Hegde, K. R., M. G. Henein, et al. (2003). "Establishment of the mouse as a model animal for the study of diabetic cataracts." Ophthalmic Res 35(1): 12-8.

Heiba, I. M., R. C. Elston, et al. (1993). "Genetic etiology of nuclear cataract: evidence for a major gene." Am J Med Genet 47(8): 1208-14.

Heijmans, B. T., J. M. Boer, et al. (2003). "A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer." Cancer Res 63(6): 1249-53.

Hejtmancik, J. F. and M. Kantorow (2004). "Molecular genetics of age-related cataract." Exp Eye Res 79(1): 3-9.

Hennis, A., S. Y. Wu, et al. (2004). "Risk factors for incident cortical and posterior subcapsular lens opacities in the Barbados Eye Studies." Arch Ophthalmol 122(4): 525-30.

Hernández-Galilea, E., González-Sarmiento, R., et al. (2003). "Expression of HOX11L1 in human adult lens epithelial cells." Ophthalmic Res (2): 35-37.

Hess, J. F., J. T. Casselman, et al. (1998). "Primary sequence, secondary structure, gene structure, and assembly properties suggests that the lens-specific cytoskeletal protein filensin represents a novel class of intermediate filament protein." Exp Eye Res 66(5): 625-44.

Hiller, R., M. J. Podgor, et al. (1998). "A longitudinal study of body mass index and lens opacities. The Framingham Studies." Ophthalmology 105(7): 1244-50.

Hiller, R., R. D. Sperduto, et al. (1997). "Cigarette smoking and the risk of development of lens opacities. The Framingham studies." Arch Ophthalmol 115(9): 1113-8.

Hingorani, A. D. (2003). "Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension." Curr Hypertens Rep 5(1): 19-25.

Hirvonen, A., K. Husgafvel-Pursiainen, et al. (1993). "The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung." Carcinogenesis 14(7): 1479-81.

Honrubia F.M.; Oftalmología General; Ed: FM Honrubia. Primera Edición, Zaragoza 2002.

Hook, D. W. and J. J. Harding (1997). "Inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by sugars, prednisolone-21-hemisuccinate, cyanate and other small molecules." Biochim Biophys Acta 1362(2-3): 232-42.

Hoyt, K. R., L. H. Tang, et al. (1992). "Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat forebrain neurons." Brain Res 592(1-2): 310-6.

Huang, Q. L., M. F. Lou, et al. (1993). "Distribution and activity of glutathione-S-transferase in normal human lenses and in cataractous human epithelia." Curr Eye Res 12(5): 433-7.

Inana, G., J. Piatigorsky, et al. (1983). "Gene and protein structure of a beta-crystallin polypeptide in murine lens: relationship of exons and structural motifs." Nature 302(5906): 310-5.

Inana, G., T. Shinohara, et al. (1982). "Evolution and diversity of the crystallins. Nucleotide sequence of a beta-crystallin mRNA from the mouse lens." J Biol Chem 257(15): 9064-71.

Inomata, M., M. Hayashi, et al. (2000). "Aminoguanidine-treatment results in the inhibition of lens opacification and calpain-mediated proteolysis in Shumiya cataract rats (SCR)." J Biochem 128(5): 771-6.

Ireland, M. and H. Maisel (1984). "A cytoskeletal protein unique to lens fiber cell differentiation." Exp Eye Res 38(6): 637-45.

Isotalo, P. A., G. A. Wells, et al. (2000). "Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations." Am J Hum Genet 67(4): 986-90.

Ito, Y., T. Nabekura, et al. (2001). "Nitric oxide participates in cataract development in selenite-treated rats." Curr Eye Res 22(3): 215-20.

Jacques, P. F., A. G. Bostom, et al. (1996). "Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations." Circulation 93(1): 7-9.

Jacques, P. F., S. M. Moeller, et al. (2003). "Weight status, abdominal adiposity, diabetes, and early age-related lens opacities." Am J Clin Nutr 78(3): 400-5.

Jick, S. S., C. Vasilakis-Scaramozza, et al. (2001). "The risk of cataract among users of inhaled steroids." Epidemiology 12(2): 229-34.

Juronen, E., G. Tasa, et al. (2000). "Polymorphic glutathione S-transferase M1 is a risk factor of primary open-angle glaucoma among Estonians." Exp Eye Res 71(5): 447-52.

Juronen, E., G. Tasa, et al. (2000). "Polymorphic glutathione S-transferases as genetic risk factors for senile cortical cataract in Estonians." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(8): 2262-7.

Jurowski, P., R. Gos, et al. (2002). "Nitric oxide levels in aqueous humor after lens extraction and poly(methyl methacrylate) and foldable acrylic intraocular lens implantation in rabbit eyes." J Cataract Refract Surg 28(12): 2188-92.

Kahn, H. A., H. M. Leibowitz, et al. (1977). "The Framingham Eye Study. II. Association of ophthalmic pathology with single variables previously measured in the Framingham Heart Study." Am J Epidemiol 106(1): 33-41.

Kajiyama, N., Y. Saito, et al. (2000). "Lack of association between T-786->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension." Hypertens Res 23(6): 561-5.

Kamei, A. (1993). "Glutathione levels of the human crystalline lens in aging and its antioxidant effect against the oxidation of lens proteins." Biol Pharm Bull 16(9): 870-5.

Kao, C. L., C. K. Chou, et al. (2002). "Nitric oxide levels in the aqueous humor in cataract patients." J Cataract Refract Surg 28(3): 507-12.

Ketterer, B., G. Fraser, et al. (1990). "Nuclear glutathione transferases which detoxify irradiated DNA." Adv Exp Med Biol 264: 301-10.

Kim, S. I. and S. J. Kim (2006). "Prevalence and risk factors for cataracts in persons with type 2 diabetes mellitus." Korean J Ophthalmol 20(4): 201-4.

Kim, Y. I. (1999). "Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications." J Nutr Biochem 10(2): 66-88.

Kistler, J., J. Berriman, et al. (1990). "Molecular portrait of lens gap junction protein MP70." J Struct Biol 103(3): 204-11.

Kistler, J. and S. Bullivant (1988). "Dissociation of lens fibre gap junctions releases MP70." J Cell Sci 91 (Pt 3): 415-21.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (1998). "Diabetes, cardiovascular disease, selected cardiovascular disease risk factors, and the 5-year incidence of age-related cataract and progression of lens opacities: the Beaver Dam Eye Study." Am J Ophthalmol 126(6): 782-90.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (1998). "Incidence of age-related cataract: the Beaver Dam Eye Study." Arch Ophthalmol 116(2): 219-25.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (2001). "Drug use and five-year incidence of age-related cataracts: The Beaver Dam Eye Study." Ophthalmology 108(9): 1670-4.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (2003). "Do multiple families alter estimates of risk for age-related cataract in a population-based study? The Beaver Dam Eye Study." Ophthalmic Epidemiol 10(2): 97-106.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (1992). "Prevalence of age-related lens opacities in a population. The Beaver Dam Eye Study." Ophthalmology 99(4): 546-52.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (1993). "Cigarette smoking and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study." Am J Prev Med 9(1): 27-30.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (1990). "Assessment of cataracts from photographs in the Beaver Dam Eye Study." Ophthalmology 97(11): 1428-33.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (1985). "Prevalence of cataracts in a population-based study of persons with diabetes mellitus." Ophthalmology 92(9): 1191-6.

Klein, B. E., R. Klein, et al. (1994). "Is there evidence of an estrogen effect on age-related lens opacities? The Beaver Dam Eye Study." Arch Ophthalmol 112(1): 85-91.

Klein, R., B. E. Klein, et al. (2004). "The relation of retinal vessel caliber to the incidence and progression of diabetic retinopathy: XIX: the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy." Arch Ophthalmol 122(1): 76-83.

Korlimbinis, A., J. A. Aquilina, et al. (2007). "Protein-bound UV filters in normal human lenses: the concentration of bound UV filters equals that of free UV filters in the center of older lenses." Invest Ophthalmol Vis Sci 48(4): 1718-23.

Korlimbinis, A. and R. J. Truscott (2006). "Identification of 3-hydroxykynurenine bound to proteins in the human lens. A possible role in age-related nuclear cataract." Biochemistry 45(6): 1950-60.

Kramar, P., C. Harris, et al. (1987). "Thermal cataract formation in rabbits." Bioelectromagnetics 8(4): 397-406.

Kuchan, M. J. and J. A. Frangos (1994). "Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells." Am J Physiol 266(3 Pt 1): C628-36.

Kupferminc, M. J., A. Eldor, et al. (1999). "Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy." N Engl J Med 340(1): 9-13.

Kuszak, J. R., C. A. Ennesser, et al. (1988). "The ultrastructure of fiber cells in primate lenses: a model for studying membrane senescence." J Ultrastruct Mol Struct Res 100(1): 60-74.

Kuszak, J. R., R. K. Zoltoski, et al. (2004). "Development of lens sutures." Int J Dev Biol 48(8-9): 889-902.

Kuzniarz, M., P. Mitchell, et al. (2001). "Use of vitamin supplements and cataract: the Blue Mountains Eye Study." Am J Ophthalmol 132(1): 19-26.

Langman S.; Embriología Médica con Orientación Clínica. Ed.: Panamericana. Décima Edición, Montana 2007.

Lerman, S. (1991). "NMR & fluorescence studies on human and animal lenses." Lens Eye Toxic Res 8(2-3): 121-54.

Leske, M. C., L. T. Chylack, Jr., et al. (1998). "Antioxidant vitamins and nuclear opacities: the longitudinal study of cataract." Ophthalmology 105(5): 831-6.

Leske, M. C., L. T. Chylack, Jr., et al. (1991). "The Lens Opacities Case-Control Study. Risk factors for cataract." Arch Ophthalmol 109(2): 244-51.

Leske, M. C., S. Y. Wu, et al. (1999). "Diabetes, hypertension, and central obesity as cataract risk factors in a black population. The Barbados Eye Study." Ophthalmology 106(1): 35-41.

Leske, M. C., S. Y. Wu, et al. (1995). "Biochemical factors in the lens opacities. Case-control study. The Lens Opacities Case-Control Study Group." Arch Ophthalmol 113(9): 1113-9.

Leske, M. C., S. Y. Wu, et al. (2002). "Risk factors for incident nuclear opacities." Ophthalmology 109(7): 1303-8.

Leske, M. C., S. Y. Wu, et al. (2000). "Incidence and progression of lens opacities in the Barbados Eye Studies." Ophthalmology 107(7): 1267-73.

Lindblad, B. E., N. Hakansson, et al. (2007). "Alcohol consumption and risk of cataract extraction: a prospective cohort study of women." Ophthalmology 114(4): 680-5.

Lorente y mendicute; Cirugía del Cristalino, Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmología. Primera Edición, Sevilla 2008.

Lu, M., E. Cho, et al. (2005). "Prospective study of dietary fat and risk of cataract extraction among US women." Am J Epidemiol 161(10): 948-59.

Lu, M., A. Taylor, et al. (2005). "Dietary fat intake and early age-related lens opacities." Am J Clin Nutr 81(4): 773-9.

Luizon, M. R., T. C. Izidoro-Toledo, et al. (2009). "Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Haplotypes in Amerindians." DNA Cell Biol.

Lumb, G., L. Mitchell, et al. (1985). "Regression of pathologic changes induced by the long-term administration of contraceptive steroids to rodents." Toxicol Pathol 13(4): 283-95.

Maraini, G., J. F. Hejtmancik, et al. (2003). "Galactokinase gene mutations and age-related cataract. Lack of association in an Italian population." Mol Vis 9: 397-400.

Maraini, G., P. Pasquini, et al. (1991). "The effect of cataract severity and morphology on the reliability of the Lens Opacities Classification System II (LOCS II)." Invest Ophthalmol Vis Sci 32(8): 2400-3.

Marangoni, K., T. G. Araujo, et al. (2008). "The -786T>C promoter polymorphism of the NOS3 gene is associated with prostate cancer progression." BMC Cancer 8: 273.

Marchesi, V. T. (1985). "The cytoskeletal system of red blood cells." Hosp Pract (Off Ed) 20(11): 113-8, 120, 125-31.

Mathers, M. J., A. S. Brandt, et al. (2009). "Metabolism of Nitric Oxide (NO) and Arginine: Significance for Male Health." Aktuelle Urol 40(4):235-41.

Mattey, D. L., N. Nixon, et al. (1993). "Alpha, mu and pi class glutathione S-transferases in human synovium and cultured synovial fibroblasts: effects of interleukin-1 alpha, hydrogen peroxide and inhibition of eicosanoid synthesis." Free Radic Res Commun 19(3): 159-71.

McCarty, C. A., B. N. Mukesh, et al. (1999). "The epidemiology of cataract in Australia." Am J Ophthalmol 128(4): 446-65.

McNulty, R., H. Wang, et al. (2004). "Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens." J Physiol 559(Pt 3): 883-98.

Meister, A. (1988). "Glutathione metabolism and its selective modification." J Biol Chem 263(33): 17205-8.

Mills, J. L., P. N. Kirke, et al. (1999). "Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts." Am J Med Genet 86(1): 71-4.

Mitchell, P., R. G. Cumming, et al. (1997). "Prevalence of cataract in Australia: the Blue Mountains eye study." Ophthalmology 104(4): 581-8.

Mizdrak, J., P. G. Hains, et al. (2008). "Tryptophan-derived ultraviolet filter compounds covalently bound to lens proteins are photosensitizers of oxidative damage." Free Radic Biol Med 44(6): 1108-19.

Mize, R. R. and F. Lo (2000). "Nitric oxide, impulse activity, and neurotrophins in visual system development(1)." Brain Res 886(1-2): 15-32.

Morris, M. S., P. F. Jacques, et al. (2004). "Moderate alcoholic beverage intake and early nuclear and cortical lens opacities." Ophthalmic Epidemiol 11(1): 53-65.

Mukesh, B. N., A. Le, et al. (2006). "Development of cataract and associated risk factors: the Visual Impairment Project." Arch Ophthalmol 124(1): 79-85.

Murakami, S., N. Matsubara, et al. (2001). "The relation between plasma homocysteine concentration and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in pregnant women." J Obstet Gynaecol Res 27(6): 349-52.

Nakayama, M., H. Yasue, et al. (2000). "T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis." Am J Cardiol 86(6): 628-34.

Nejatizadeh, A., R. Kumar, et al. (2008). "Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and circulating nitric oxide levels significantly associate with risk of essential hypertension." Free Radic Biol Med 44(11): 1912-8.

Nielsen, N. V. and T. Vinding (1984). "The prevalence of cataract in insulin-dependent and non-insulin-dependent-diabetes mellitus." Acta Ophthalmol (Copenh) 62(4): 595-602.

Noran, N. H., N. Salleh, et al. (2007). "Relationship between reproductive exposures and age-related cataract in women." Asia Pac J Public Health 19(2): 23-8.

Obata, T. (2002). "Nitric oxide and depolarization induce hydroxyl radical generation." Jpn J Pharmacol 88(1): 1-5.

Obata, T. (2006). "Nitric oxide and MPP+-induced hydroxyl radical generation." J Neural Transm 113(9): 1131-44.

Ogino, H. and K. Yasuda (2000). "Sequential activation of transcription factors in lens induction." Dev Growth Differ 42(5): 437-48.

Ohta, Y., T. Yamasaki, et al. (2000). "Preventive effect of vitamin E-containing liposome instillation on cataract progression in 12-month-old rats fed a 25% galactose diet." J Ocul Pharmacol Ther 16(4): 323-35.

Ohtoshi, K., Y. Yamasaki, et al. (2002). "Association of (-)786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance." Diabetologia 45(11): 1594-601.

Okano, Y., M. Asada, et al. (2001). "A genetic factor for age-related cataract: identification and characterization of a novel galactokinase variant, "Osaka," in Asians." Am J Hum Genet 68(4): 1036-42.

Ornek, K., F. Karel, et al. (2003). "May nitric oxide molecule have a role in the pathogenesis of human cataract?" Exp Eye Res 76(1): 23-7.

Ostberg, A., A. Loth, et al. (2006). "Skovde cataract study: I. Prevalence of lens opacities in a Swedish community." Ophthalmology 113(6): 970-5.

Overbeek, P. A., A. B. Chepelinsky, et al. (1985). "Lens-specific expression and developmental regulation of the bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene driven by the murine alpha A-crystallin promoter in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 82(23): 7815-9.

Pacanowski, M. A., I. Zineh, et al. (2009). "Genetic and Pharmacogenetic Associations Between NOS3 Polymorphisms, Blood Pressure, and Cardiovascular Events in Hypertension." Am J Hypertens 22(7):748-53.

Paik, D. C. and J. Dillon (2000). "The Nitrite/alpha crystallin reaction: a possible mechanism in lens matrix damage." Exp Eye Res 70(1): 73-80.

Panchapakesan, J., E. Rochtchina, et al. (2003). "Myopic refractive shift caused by incident cataract: the Blue Mountains Eye Study." Ophthalmic Epidemiol 10(4): 241-7.

Parmigiani, C. and J. McAvoy (1984). "Localisation of laminin and fibronectin during rat lens morphogenesis." Differentiation 28(1): 53-61.

Parmigiani, C. M. and J. W. McAvoy (1989). "A morphometric analysis of the development of the rat lens capsule." Curr Eye Res 8(12): 1271-7.

Pastor-Valero, M., A. E. Fletcher, et al. (2007). "Years of sunlight exposure and cataract: a case-control study in a Mediterranean population." BMC Ophthalmol 7: 18.

Paz, M. F., S. Avila, et al. (2002). "Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors." Cancer Res 62(15): 4519-24.

Persaud y moore; Embriología Clínica; Ed: Mc-Graw Hill Internacional. Sexta Edición, México 1999.

Pianka, P., Y. Almog, et al. (2000). "Hyperhomocystinemia in patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy, central retinal artery occlusion, and central retinal vein occlusion." Ophthalmology 107(8): 1588-92.

Piatigorsky, J., M. Kantorow, et al. (1994). "Recruitment of enzymes and stress proteins as lens crystallins." EXS 71: 241-50.

Piatigorsky J., Kozmik Z., et al.(2000)."Omega -crystallin of the scallop lens. A dimeric aldehyde dehydrogenase class 1/2 enzyme-crystallin".Biol Chem. 29;275(52):41064-73.

Pisano, M. M. and A. B. Chepelinsky (1991). "Genomic cloning, complete nucleotide sequence, and structure of the human gene encoding the major intrinsic protein (MIP) of the lens." Genomics 11(4): 981-90.

Pokhrel, A. K., K. R. Smith, et al. (2005). "Case-control study of indoor cooking smoke exposure and cataract in Nepal and India." Int J Epidemiol 34(3): 702-8.

Raghavachari, N., F. Qiao, et al. (1999). "Does glutathione-S-transferase dethiolate lens protein-thiol mixed disulfides?-A comparative study with thioltransferase." Exp Eye Res 68(6): 715-24.

Reddy, V. N. and F. J. Giblin (1984). "Metabolism and function of glutathione in the lens." Ciba Found Symp 106: 65-87.

Resnikoff, S., D. Pascolini, et al. (2004). "Global data on visual impairment in the year 2002." Bull World Health Organ 82(11): 844-51.

Reza, H. M., H. Ogino, et al. (2002). "L-Maf, a downstream target of Pax6, is essential for chick lens development." Mech Dev 116(1-2): 61-73.

Robman, L. and H. Taylor (2005). "External factors in the development of cataract." Eye 19(10): 1074-82.

Rosenberg, N., M. Murata, et al. (2002). "The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans." Am J Hum Genet 70(3): 758-62.

Rothe, F., H. Possel, et al. (2002). "Nitric oxide affects the phosphorylation state of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and neurofilament: an immunocytochemical study in the brain of rats and neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-knockouts." Nitric Oxide 6(1): 9-17.

Sambrook j. and Fritsch E.F.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition, New York 1989.

Sasaki, H., Y. Kawakami, et al. (2003). "Localization of cortical cataract in subjects of diverse races and latitude." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(10): 4210-4.

Saw, S. M., G. Gazzard, et al. (2005). "Myopia and associated pathological complications." Ophthalmic Physiol Opt 25(5): 381-91.

Saxena, S., P. Mitchell, et al. (2004). "Five-year incidence of cataract in older persons with diabetes and pre-diabetes." Ophthalmic Epidemiol 11(4): 271-7.

Schaumberg, D. A., R. J. Glynn, et al. (2001). "A prospective study of blood pressure and risk of cataract in men." Ann Epidemiol 11(2): 104-10.

Schmidtko, A., I. Tegeder, et al. (2009). "No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing." Trends Neurosci 32(6): 339-46.

Schulz, E., T. Jansen, et al. (2008). "Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension." Antioxid Redox Signal 10(6): 1115-26.

Sekine, Y., S. Hommura, et al. (1995). "Frequency of glutathione-S-transferase 1 gene deletion and its possible correlation with cataract formation." Exp Eye Res 60(2): 159-63.

Serrano, N. C., J. P. Casas, et al. (2004). "Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study." Hypertension 44(5): 702-7.

Seven, I., N. Turkozkan, et al. (2005). "The effects of nitric oxide synthesis on the Na⁺ ,K(+)-ATPase activity in guinea pig kidney exposed to lipopolysaccharides." Mol Cell Biochem 271(1-2): 107-12.

Shen, J. C., W. M. Rideout, 3rd, et al. (1992). "High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase." Cell 71(7): 1073-80.

Simons, F. E., M. P. Persaud, et al. (1993). "Absence of posterior subcapsular cataracts in young patients treated with inhaled glucocorticoids." Lancet 342(8874): 776-8.

Slattery, M. L., T. D. Berry, et al. (1997). "Diet diversity, diet composition, and risk of colon cancer (United States)." Cancer Causes Control 8(6): 872-82.

Sliney, D. H. (1994). "Epidemiological studies of sunlight and cataract: the critical factor of ultraviolet exposure geometry." Ophthalmic Epidemiol 1(2): 107-19.

Slingsby, C., H. P. Driessen, et al. (1988). "Evolutionary and functional relationships between the basic and acidic beta-crystallins." Exp Eye Res 46(3): 375-403.

Smolich, B. D., S. K. Tarkington, et al. (1994). "Xenopus gamma-crystallin gene expression: evidence that the gamma-crystallin gene family is transcribed in lens and nonlens tissues." Mol Cell Biol 14(2): 1355-63.

Sorrells, D. L., C. Friend, et al. (1996). "Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo." Arch Surg 131(11): 1155-63.

Sparrow, J. M., A. J. Bron, et al. (1986). "The Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System." Int Ophthalmol 9(4): 207-25.

Spector, A. (1984). "The search for a solution to senile cataracts. Proctor lecture." Invest Ophthalmol Vis Sci 25(2): 130-46.

Spector, A. (1995). "Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action." FASEB J 9(12): 1173-82.

Sperduto, R. D. and R. Hiller (1984). "The prevalence of nuclear, cortical, and posterior subcapsular lens opacities in a general population sample." Ophthalmology 91(7): 815-8.

Stasiv, Y., B. Kuzin, et al. (2004). "Regulation of multimers via truncated isoforms: a novel mechanism to control nitric-oxide signaling." Genes Dev 18(15): 1812-23.

Stokstad, E. L. and J. Koch (1967). "Folic acid metabolism." Physiol Rev 47(1): 83-116.

Sturmer, J. (2009). "[Cataracts - trend and new developments]." Ther Umsch 66(3): 167-71.

Sweeney, M. H. and R. J. Truscott (1998). "An impediment to glutathione diffusion in older normal human lenses: a possible precondition for nuclear cataract." Exp Eye Res 67(5): 587-95.

Tan, A. G., P. Mitchell, et al. (2008). "Retinal vessel caliber and the long-term incidence of age-related cataract: the Blue Mountains Eye Study." Ophthalmology 115(10): 1693-8, 1698 e1.

Tan, J. S., J. J. Wang, et al. (2008). "Influence of diabetes and cardiovascular disease on the long-term incidence of cataract: the Blue Mountains eye study." Ophthalmic Epidemiol 15(5): 317-27.

Taylor, A., P. F. Jacques, et al. (2002). "Long-term intake of vitamins and carotenoids and odds of early age-related cortical and posterior subcapsular lens opacities." Am J Clin Nutr 75(3): 540-9.

Taylor, H. R., S. K. West, et al. (1988). "Effect of ultraviolet radiation on cataract formation." N Engl J Med 319(22): 1429-33.

Tesauro, M., W. C. Thompson, et al. (2000). "Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298." Proc Natl Acad Sci U S A 97(6): 2832-5.

Trevithick, J. R. and K. P. Mitton (2000). "Vitamins C and E in cataract risk reduction." Int Ophthalmol Clin 40(4): 59-69.

Tripathi, R. C. and B. J. Tripathi (1983). "Lens morphology, aging, and cataract." J Gerontol 38(3): 258-70.

Truscott, R. J. and R. C. Augusteyn (1977). "The state of sulphhydryl groups in normal and cataractous human lenses." Exp Eye Res 25(2): 139-48.

Tsujita, Y., S. Baba, et al. (2001). "Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study." J Hypertens 19(11): 1941-8.

Ueland, P. M., O. Nygard, et al. (2001). "The Hordaland Homocysteine Studies." Lipids 36 Suppl: S33-9.

Urban, R. C., Jr. and E. Cotlier (1986). "Corticosteroid-induced cataracts." Surv Ophthalmol 31(2): 102-10.

Van Boekel, M. A. and H. J. Hoenders (1992). "Glycation of crystallins in lenses from aging and diabetic individuals." FEBS Lett 314(1): 1-4.

Van der Put, N. M., F. Gabreels, et al. (1998). "A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?" Am J Hum Genet 62(5): 1044-51.

Van der Put N.M., Steegers-Theunissen R.P.,et al.(1995)."Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida".Lancet. 21;346(8982):1070-1

Varma, S. D., K. Hegde, et al. (2003). "Oxidative damage to mouse lens in culture. Protective effect of pyruvate." Biochim Biophys Acta 1621(3): 246-52.

Varma, S. D. and K. R. Hegde (2007). "Susceptibility of the ocular lens to nitric oxide: implications in cataractogenesis." J Ocul Pharmacol Ther 23(2): 188-95.

Volcik, K. A., S. H. Blanton, et al. (2001). "Examinations of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutations--and in utero viability." Am J Hum Genet 69(5): 1150-3.

Von Bohlen und Halbach, O. (2003). "Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes." Nitric Oxide 9(4): 217-28.

Voorter C.E., Kistler J.,et al.(1989). "Distribution of MP17 in isolated lens fibre membranes". Curr Eye Res.;8(7):697-706

Weintraub, J. M., W. C. Willett, et al. (2002). "Smoking cessation and risk of cataract extraction among US women and men." Am J Epidemiol 155(1): 72-9.

Weisberg, I., P. Tran, et al. (1998). "A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity." Mol Genet Metab 64(3): 169-72.

West, S., B. Munoz, et al. (1989). "Cigarette smoking and risk of nuclear cataracts." Arch Ophthalmol 107(8): 1166-9.

West, S. K. (2000). "Looking forward to 20/20: a focus on the epidemiology of eye diseases." Epidemiol Rev 22(1): 64-70.

West, S. K., D. D. Duncan, et al. (1998). "Sunlight exposure and risk of lens opacities in a population-based study: the Salisbury Eye Evaluation project." JAMA 280(8): 714-8.

West, S. K., J. D. Longstreth, et al. (2005). "Model of risk of cortical cataract in the US population with exposure to increased ultraviolet radiation due to stratospheric ozone depletion." Am J Epidemiol 162(11): 1080-8.

West, S. K., B. Munoz, et al. (1998). "Racial differences in lens opacities: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) project." Am J Epidemiol 148(11): 1033-9.

White, H. E., H. P. Driessen, et al. (1989). "Packing interactions in the eye-lens. Structural analysis, internal symmetry and lattice interactions of bovine gamma IVa-crystallin." J Mol Biol 207(1): 217-35.

Wiencke, J. K., S. Pemble, et al. (1995). "Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 4(3): 253-9.

Wistow, G., C. Slingsby, et al. (1981). "Eye-lens proteins: the three-dimensional structure of beta-crystallin predicted from monomeric gamma-crystallin." FEBS Lett 133(1): 9-16.

Wistow, G. J. and J. Piatigorsky (1988). "Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue." Annu Rev Biochem 57: 479-504.

Wong, T. Y., B. E. Klein, et al. (2001). "Refractive errors and incident cataracts: the Beaver Dam Eye Study." Invest Ophthalmol Vis Sci 42(7): 1449-54.

Worzala, K., R. Hiller, et al. (2001). "Postmenopausal estrogen use, type of menopause, and lens opacities: the Framingham studies." Arch Intern Med 161(11): 1448-54.

Yano, H., K. Nakaso, et al. (2004). "Mutations of the MTHFR gene (428C>T and [458G>T+459C>T]) markedly decrease MTHFR enzyme activity." Neurogenetics 5(2): 135-40.

Yilmaz, G., M. A. Acar, et al. (2000). "Aqueous humor nitric oxide levels in patients with central retinal artery occlusion." Retina 20(6): 610-3.

Younan, C., P. Mitchell, et al. (2002). "Hormone replacement therapy, reproductive factors, and the incidence of cataract and cataract surgery: the Blue Mountains Eye Study." Am J Epidemiol 155(11): 997-1006.

Zammiti, W., N. Mtiraoui, et al. (2008). "Lack of consistent association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, homocysteine levels and recurrent pregnancy loss in tunisian women." Am J Reprod Immunol 59(2): 139-45.

Zampighi, G. A., J. E. Hall, et al. (1989). "The structural organization and protein composition of lens fiber junctions." J Cell Biol 108(6): 2255-75.

Zanchi, A., D. K. Moczulski, et al. (2000). "Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism." Kidney Int 57(2): 405-13.

Zarina, S., H. R. Zhao, et al. (2000). "Advanced glycation end products in human senile and diabetic cataractous lenses." Mol Cell Biochem 210(1-2): 29-34.

Zetterberg, M., G. Tasa, et al. (2005). "Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms in patients with cataract." Am J Ophthalmol 140(5): 932-4.

Zhong, S., A. F. Howie, et al. (1991). "Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility." Carcinogenesis 12(9): 1533-7.

Zigler, J. S., Jr. and P. V. Rao (1991). "Enzyme/crystallins and extremely high pyridine nucleotide levels in the eye lens." FASEB J 5(2): 223-5.