



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO OFTALMOLOGÍA
FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

**Estudio de asociación de polimorfismos de riesgo para
retinopatía diabética en la población mexicana**

TESIS DE POSGRADO
Para obtener el diploma en especialidad de

OFTALMOLOGIA

Presenta

Dra. Alejandra Guzmán Verduzco

Director de tesis

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz

México D.F. 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Enrique Graue Wiechers
Profesor de curso

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz
Director de tesis

Dr. José Luis Rodríguez Loaiza
Jefe de enseñanza

CESION DE DERECHOS

En la ciudad de México D. F., el día 23 de agosto de 2012, el que suscribe Dra. Alejandra Guzmán Verduzco, alumno del Programa de Oftalmología de la Facultad de Medicina, sede académica Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada “Conde de Valenciana” I.A.P, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz, tutor de tesis y cede los derechos del trabajo intitulado “Identificación de variantes genéticas que confieren riesgo para el desarrollo de retinopatía diabética utilizando análisis de genoma completo” a la Universidad Nacional Autónoma de México para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben de reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director del trabajo bajo reserva de contravenir tácitamente a la ley Federal de derechos y protección del autor. El permiso puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección electrónica jczenteno@institutodeoftalmologia.org. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y cita la fuente del mismo.

Dra. Alejandra Guzmán Verduzco
Programa de Oftalmología de la Facultad de Medicina
Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana” I.A.P

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz
Jefe del departamento de genética
Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana” I.A.P

Índice

I.	Introducción	5
II.	Planteamiento del problema	10
III.	Justificación	12
IV.	Objetivos	13
V.	Diseño de estudio	14
VI.	Material y métodos	17
	Criterios de inclusión	
	Criterios de exclusión	
	Criterios de eliminación	
	Tamaño de la muestra	
	Metodología	
VII.	Aspectos éticos	22
VIII.	Resultados	23
	Descripción de los pacientes	
	Análisis por frecuencia fenotípica	
IX.	Discusión	29
X.	Conclusiones	30
XI.	Referencias	31

I.

INTRODUCCIÓN

Para el año 2000 se estimó que en el mundo existían 171 millones de personas afectadas por la diabetes y se calculó que para el 2030 se incrementará a 366 millones de personas¹.

La hiperglucemia es una condición en la que el nivel elevado persistentemente de glucosa en sangre incrementa el riesgo para daño microvascular, lo que se asocia a una reducción en la esperanza de vida, aumento en la morbilidad y la mortalidad.

Según la Federación Internacional de la Diabetes esta condición es actualmente una de las enfermedades no transmisibles más comunes a escala mundial. La Asociación Americana de Diabetes estimó que el costo de la diabetes en EUA es de 132 billones de dólares en el 2002, 174 billones de dólares en el 2007 y se incrementará a 192 billones de dólares en el 2020, mientras que en México el costo por paciente con diabetes es de aproximadamente 3 193 dólares al año^{2,3,4}.

En México, de acuerdo a la encuesta nacional de salud, la prevalencia es de 7.5%, estimándose que existen 3.6 millones de diabéticos entre los 20 y 69 años de edad^{5,6,7}.

Se ha reportado que en la población estadounidense las poblaciones Mexicano-Americana y Africano-Americana, poseen mayor prevalencia y peor severidad de retinopatía diabética, lo que indica la posible participación de factores genéticos^{8,15}.

A pesar de que en la actualidad se dispone de una gran variedad de herramientas para el tratamiento, las complicaciones como la nefropatía y la retinopatía continúan siendo responsables de la morbilidad más frecuente asociada a diabetes mellitus tipo 2. En el hemisferio occidental, la retinopatía diabética es la causa más común de ceguera en población en edad productiva; la Organización Mundial de la Salud ha estimado que cada año se diagnostican 5800 casos nuevos de ceguera legal por esta causa, lo que corresponde al 5% de los 37 millones de ciegos en el mundo⁹. Más del 75% de los diabéticos con más de 20 años de evolución, tiene alguna forma de retinopatía según el estudio epidemiológico de Wisconsin, que también demostró que el 13% de los diabéticos con 5 años de evolución tienen algún grado de retinopatía, que aumenta al 90% en sujeto con 15 años de evolución, cuando la diabetes se diagnostica antes de los 30 años de edad y a 84% cuando se diagnostica después de los 30 años de edad^{10,11}.

Con respecto a la fisiopatología de la retinopatía diabética, en el año 1912, Maillard fue el primero en reportar la formación de sustancias de color marrón por la reacción no-enzimática entre azúcares y aminoácidos. Maillard denominó “melanoidinas” a los productos finales. Esta

“reacción de Maillard” (sinónimo de glicosilación), como demostraron en 1981 Monnier y Cerami, tiene lugar en el cuerpo humano, donde la síntesis de proteínas irreversiblemente glicosiladas, denominadas “Productos de Glicosilación Avanzada” (PGA) se forman en personas diabéticas (y en mucho menor medida en no diabéticas con la edad avanzada) en presencia de hiperglicemia crónica, y pueden acumularse en proteínas de larga vida, como en el cristalino del ojo, en el colágeno de las membranas basales de los capilares retinianos y glomerulares, y también en el componente proteico de la mielina en el sistema nervioso periférico. La glicosilación de proteínas puede dividirse en tres fases: iniciación, propagación y PGA¹².

La iniciación va desde la formación de la base de Schiff hasta el producto Amadori (ej. hemoglobina glicosilada). La fase de propagación parte con la formación de los dicarbonilos oxidantes glioxal y de 3-deoxiglucosona, que son producto de la desglicosilación de parte del producto Amadori, y que son potentes agentes glicantes, capaces de catalizar nuevas reacciones de unión de glucosa a proteínas. La fase de PGA comienza en presencia de hiperglicemia persistente por años, precisamente con la unión de la pirralina y de la N-carboximetil-lisina con una segunda proteína, formando “PGA no fluorescentes que forman puente”, llamados “puente DOLD” y “puente GOLD”. Al formarse estos puentes, se alteran irreversiblemente las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas¹².

En el cristalino del ojo, las proteínas glicosiladas contribuyen a su opacificación y a la formación de cataratas. En los nervios periféricos, la glicosilación del componente proteico de la mielina hace a ésta apetecible para ser fagocitada por macrófagos que tienen receptores de PGA, contribuyendo así a la génesis de la neuropatía diabética¹².

En la histología de la retinopatía, inicialmente se afectan los pericitos, debido al acumulo del sorbitol, lo que produce que pierdan su capacidad contráctil y secundariamente mueran. Simultáneamente, la pared capilar, cuya membrana basal se ha glicosilado, aumenta su permeabilidad, produciéndose una vasodilatación, en parte, a la pérdida de pericitos y en parte a la activación de la b2-protein cinasa C; permitiendo la salida de plasma rico en lipoproteínas, formándose los exudados céreos; al mismo tiempo, la pared capilar debilitada, puede agrietarse y producir microhemorragias. El debilitamiento de la pared capilar puede llegar al extremo de causar microaneurismas, donde pueden formarse microtrombos, con la consiguiente oclusión capilar e isquemia retinal. Al sumarse esta última con otros factores que reducen el flujo capilar se producen microinfartos de retina clínicamente observadas como lesiones algodinosas. En esta etapa, los tejidos retinales tratan de defenderse de la isquemia, produciendo sustancias que estimulan el crecimiento de nuevos capilares, particularmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)¹².

En presencia de hiperglicemia, la enzima aldosa reductasa (ALR) produce sorbitol a partir de glucosa, y otra enzima, la sorbitol deshidrogenasa, transforma el sorbitol en fructosa. El NADP+ y el NADH procedentes de estas reacciones, desvían el metabolismo de la glucosa hacia una vía aparte, llamada síntesis de novo de diacil-glicerol (DAG). El DAG es un activador natural de la

proteín cinasa C (PKC-βII). Esta última aumenta la expresión de endotelina-1, citocina que hace disminuir el flujo capilar, causando “isquemia retiniana de la fase del pericito”. La respuesta del pericito es la producción de VEGF, mediante la estabilización de su ARN mensajero. Ahora bien, el VEGF recién producido por el pericito estimula receptores en la célula endotelial subyacente, y justo cuando está comenzando a ejercer sus dos efectos allí, el pericito muere, destruido por los efectos combinados del sorbitol y de los AGE^{12,13}.

La ocludina, proteína fosforilada en la fase previa, permite la apertura de las uniones intercelulares, con salida de plasma rico en lipoproteínas, generando así los exudados céreos. La mitosis de las células endoteliales (estimulada por la PKCβII de la fase previa), sumada al debilitamiento estructural de la pared capilar y la resultante “isquemia endotelio-dependiente” genera aún más VEGF, el cual estimula el crecimiento de vasos de neoformación y de paso fosforila más ocludina, lo que incrementa la permeabilidad capilar aún más¹².

De acuerdo al ETDRS¹⁴ la Retinopatía Diabética se puede clasificar en una etapa temprana o Retinopatía Diabética No Proliferativa (RDNP) y una más avanzada o Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP). La RDNP se subdivide a su vez en leve, moderada, y severa. La RDP se subdivide en temprana, de alto riesgo y avanzada.

Retinopatía Diabética No Proliferativa (RDNP)

Los cambios que se producen en la RDNP están limitados a la retina. Los elementos característicos que se pueden apreciar en el examen oftalmoscópico comprenden microaneurismas, hemorragias intraretinales, edema retinal, exudados céreos o lipídicos, dilataciones venosas, anomalías intraretinales microvasculares, lesiones algodinosas, anomalías arteriolas y áreas de cierre capilar. Según el ETDRS, los pacientes con RDNP severa tienen un 15% de posibilidades de progresar a RDP de alto riesgo en un año y los que padecen RDNP muy severa tienen un 45% de posibilidades de progresar a RDP de alto riesgo en un año.¹⁴

Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP)

La isquemia progresiva que se produce en la Retinopatía Diabética, debido al cierre capilar, tiene como consecuencia la formación de vasos retinianos de neoformación o neovasos, los cuales, junto a un tejido fibroso que los acompaña, proliferan más allá de la retina. Es lo que se denomina proliferación extrarretinal. La aparición de estos neovasos es lo que define a la Retinopatía Diabética Proliferativa. La progresión de la neovascularización aumenta el riesgo de hemorragias

prerretinales o vítreas. En etapas más avanzadas, esta proliferación fibrovascular, que se ha anclado en el humor vítreo, puede traccionar la retina produciendo un desprendimiento de retina traccional, o romperla en los puntos de adherencia a ésta (desgarro retiniano), ocasionando un desprendimiento de retina regmatógeno. La RDP evoluciona en tres etapas de menor a mayor severidad: temprana, de alto riesgo y avanzada. Esto está dado por la ubicación y extensión de los neovasos, la presencia o ausencia de hemorragia vítrea y la presencia o ausencia de desprendimiento de retina con compromiso foveal.²²

Factores Genéticos en retinopatía diabética

La secuencia de DNA es idéntica entre los humanos con excepción de un 0.5%, que corresponde a aproximadamente 15 millones de bases; siendo estas las que originan las diferencias interindividuales así como las que confieren susceptibilidad a enfermedades o diferencias en la respuesta a fármacos.

En un estudio de gemelos idénticos se obtuvo una concordancia para la retinopatía diabética en 21 de 31 pares con diabetes tipo I, es decir, un 68%; y en 35 de 37 con diabetes tipo II, un 95%¹⁶.

La mayoría de los genes estudiados en la retinopatía diabética están implicados en las vías de la fisiopatología de la misma, como la vía del poliol, los productos avanzados de glucosilación, la activación de la proteína C quinasa y la angiogénesis inducida por hipoxia¹⁷.

En un estudio de meta-análisis realizado en población caucásica, se determinaron diferentes locus genéticos asociados a complicaciones de la diabetes mellitus¹⁸. En un análisis de pares de hermanos en el grupo étnico de los indios Pyma en Estados Unidos mostro evidencia de una relación entre la retinopatía diabética y loci en los cromosomas 3 y 9¹⁹.

La población Mexicana es uno de los grupos étnicos con mayor incidencia de retinopatía diabética, lo que indica que factores genéticos propios de nuestra población, en conjunto con diversos factores ambientales, son responsables de la alta incidencia de esta complicación de la diabetes. La identificación de variantes genéticas específicas de población Mexicana que confieran riesgo para el desarrollo de retinopatía diabética constituiría un avance sumamente importante en el abordaje de esta enfermedad común en nuestro país, además de que contribuiría de manera sustancial a identificar los procesos fisiopatológicos de la enfermedad. La identificación de variantes genéticas propias de población Mexicana que eleven el riesgo para el desarrollo de retinopatía diabética permitiría identificar tempranamente a grupos de diabéticos con riesgo de desarrollar esta complicación y establecer programas preventivos que impidan la discapacidad visual.

El un estudio realizado recientemente en el condado de Starr, Texas,²⁰ se incluyeron 794 diabéticos pertenecientes a 393 familias mexico-americanas que presentaban al menos 2 integrantes

con diagnóstico de diabetes, propuso 25 genes potenciales para retinopatía diabética ubicados en los cromosomas 3, 6, 12, 15, 19 y 20. En un estudio posterior realizado por el mismo grupo, donde se incluyeron 286 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, se identificaron diferentes marcadores asociados con retinopatía diabética severa ubicados en los cromosomas 1, 2, 3, 5, 11, 15, 18, observándose que los que presentaban razones de momios mas elevadas correspondían al polimorfismo de base única o SNP (single nucleotide polymorphism) rs10501943 ubicado en el cromosoma 11 (OR 3.04) y el rs699549 ubicado en cromosoma 2 (OR 4.27).²¹ Este estudio indicó que esas dos variantes o SNPs elevan entre 2 y 3.5 veces el riesgo de padecer retinopatía diabética en sujetos de origen Mexicano.

II.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes mellitus se considera un problema de salud, en el hemisferio occidental y la retinopatía diabética, una de sus complicaciones más frecuentes, es la causa mas común de ceguera en población en edad productiva; se ha estimado que cada año se diagnostican 5800 casos nuevos de ceguera legal debido a retinopatía diabética. Por otra parte, el 25% de la población diabética mundial padece algún grado de retinopatía diabética y el 5% tiene un grado avanzado de la misma. La identificación de variantes genéticas que eleven el riesgo de padecer retinopatía diabética en nuestra población, permitirá identificar precozmente a sujetos en riesgo y establecer programas de tratamiento y monitorización mas agresivos para evitar tal complicación. Recientemente se demostró en una población Mexico-Americana que los polimorfismos rs10501943 y rs699549 elevan entre 2 y 3.5 veces el riesgo de desarrollar retinopatía diabética.

Pregunta de investigación:

¿Existe asociación entre los polimorfismos rs10501943 y rs699549 y el riesgo para retinopatía diabética en una muestra de población mexicana?

Hipótesis:

1. Existe asociación entre el polimorfismo rs10501943 y/o el polimorfismo rs699549 el riesgo de desarrollar retinopatía diabética en una muestra de población Mexicana.

III.

JUSTIFICACIÓN

No se han realizado estudios de asociación entre variantes genéticas específicas y el riesgo de desarrollar retinopatía diabética en población Mexicana. La identificación de tales variantes permitiría contribuir a una mejor comprensión de la fisiopatología de esta complicación y podría ayudar a reconocer a individuos con riesgo genético elevado. La población Mexicana es uno de los grupos étnicos con mayor incidencia de retinopatía diabética y esta complicación es la causa más prevalente de ceguera en la edad adulta en nuestro país.

IV.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar un estudio de asociación genética entre los polimorfismos de base única rs10501943 y rs699549 y la ocurrencia de retinopatía diabética en una muestra de pacientes Mexicanos.

Objetivos específicos:

1. Comparar la frecuencia del polimorfismo rs10501943 entre sujetos con retinopatía diabética y diabéticos sin retinopatía diabética y establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.
2. Comparar la frecuencia del polimorfismo rs699549 entre sujetos con retinopatía diabética y diabéticos sin retinopatía diabética y establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio transversal y descriptivo. Se incluyeron 132 sujetos en la investigación. 73 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 correspondieron al grupo de retinopatía diabética (50 sujetos con retinopatía diabética proliferativa y 23 con retinopatía no proliferativa severa). Se incluyeron sujetos de uno u otro género sin importar el tiempo de evolución de la retinopatía diabética. Los pacientes fueron clasificados clínicamente mediante el protocolo de ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study). Se incluyeron 132 sujetos en la investigación. 73 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 correspondieron al grupo de retinopatía diabética (50 sujetos con retinopatía diabética proliferativa y 23 con retinopatía no proliferativa severa). Se incluyeron sujetos de uno u otro género sin importar el tiempo de evolución de la retinopatía diabética. Los pacientes fueron clasificados clínicamente mediante el protocolo de ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study).

Extracción de DNA genómico: Se aislará DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica provenientes de una muestra de 2 mL de sangre en cada sujeto participante. La extracción del DNA se realizará con el kit Fuji Film para sangre total y la muestra se procesará en el equipo semiautomatizado de extracción de ácidos nucleicos QuickGene. EL DNA obtenido se resuspenderá en 300 microlitros de Buffer y se almacenará a -20oC hasta su utilización. Determinación de la concentración y pureza del DNA : Se determinará la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. La relación 260/280 permitirá evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se considerarán adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y

2. Además, se realizarán electroforesis en geles de agarosa de cada muestra obtenida para verificar que no exista degradación de del DNA. La concentración de DNA obtenida se determinará por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/ microlitros.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): se llevó a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos de DNA que incluyen a los polimorfismos rs10501943 y rs699549 utilizando pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia adyacente publica en la base de datos dbSNP. Cada reacción de amplificación de PCR tuvo un volumen final de 15 microlitros que incluyó buffer para PCR 1X, de 50-100 ngs de DNA genómico, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTP's, 2.5 unidades de enzima TaqPolimerasa, 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido), MgCl₂ entre 1 y 3 mM y agua bidestilada c.b.p. 25 microlitros. Se utilizó un programa de temperaturas que incluyó 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos y 1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizó un ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final. Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pares de bases. Se reconocieron las bandas de interés y se escindieron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Qiagen)

SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DIRECTA: Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de los dos fragmentos amplificados por PCR. Cada reacción de 10 microlitros contuvo 2 microlitros del reactivo BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) con los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxionucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y la

enzima ampli-Taq polimerasa; se agregará además 1 microlitro del oligonucleótido correspondiente (sentido o antisentido) a una concentración de 10 micromolar, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 20 microlitros. Para esta reacción de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión. Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 microlitros de formamida y posteriormente se desnaturalizaron a 95°C por 5 min. Los productos se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos y en controles se compararon con las secuencias silvestres para identificar los alelos correspondientes a cada SNP.

VI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con retinopatía diabética no proliferativa moderada o severa.
2. Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con retinopatía diabética proliferativa.
3. Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 mayor de 13 años de diagnóstico sin datos de retinopatía diabética.
4. Pacientes que estuvieron de acuerdo en participar en el estudio mediante firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes sin diabetes mellitus tipo 2.
2. Pacientes en los que no sea posible coleccionar muestra de DNA.

Criterios de eliminación:

1. Pacientes cuya muestra recolectada de DNA sea insuficiente.

Variables independientes del estudio:

Variables demográficas

Edad

Tipo de variable: Cuantitativa.

Escala de medición: Continua.

Definición operacional: Tiempo transcurrido desde el nacimiento del paciente hasta su inclusión en el estudio.

Unidad de medición: Años.

Género

Tipo de variable: Cualitativa.

Escala de medición: Ordinal

Definición operacional: Hombre o mujer.

Variables dependientes del estudio:

Tiempo de evolución de diabetes mellitus

Tipo de variable: Cuantitativa.

Escala de medición: Continua.

Definición operacional: Tiempo transcurrido desde el diagnóstico de diabetes mellitus tipo dos hasta su inclusión en el estudio.

Unidad de medición: Años.

Etapa de retinopatía diabética

Tipo de variable: Cualitativa.

Escala de medición: Nominal.

Definición operacional: Se definió ausencia o presencia y grado de retinopatía diabética de acuerdo al estudio de ETDRS con fundoscopia indirecta.

Unidad de medición:

- | | |
|----------|--|
| A. No RD | Sin lesiones en la fundoscopia |
| B. RDNP | <p><i>Leve:</i> microhemorragias, con hemorragias retinianas leves, exudados duros, exudados blandos.</p> <p><i>Moderada:</i> lesiones más avanzadas que en la leve, pero menos de “la regla de 4:2:1”</p> <p><i>Grave:</i> un criterio de “la regla 4:2:1”:</p> <ul style="list-style-type: none">- Microhemorragias / hemorragias retinianas secreras en 4 cuadrantes- Arrozamiento venoso al menos en 2 cuadrantes- Anomalías microvasculares intrarretinianas moderado o extenso en al menos 1 cuadrante <p><i>Muy grave:</i> al menos dos criterios de “la regla 4:2:1”</p> |
| C. RPD | <p><i>Sin características de alto riesgo</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Neovascularización extrapapilar en cualquier extensión sin hemorragia vítrea / subhialoidea- Neovascularización papilar de extensión menor a un cuarto del área papilar |

Con características de alto riesgo

- Neovascularización papilar de extensión mayor a un cuarto de área papilar
- Hemorragia subhialoidea / vítrea con neovascularización papilar de cualquier extensión o con neovascularización extrapapilar mayor a media área papilar

Avanzada o retinopatía diabética proliferativa grave

- Hemorragias vitreas muy extensas (no permiten valorar neovasos)
- Desprendimiento de retina traccional macular
- Glaucoma neovascular
- Ptisis bulbi

Tamaño de la muestra

Se incluyeron 132 sujetos en la investigación. 73 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 correspondieron al grupo de retinopatía diabética (50 sujetos con retinopatía diabética proliferativa y 23 con retinopatía no proliferativa severa). Se incluyeron sujetos de uno u otro género sin importar el tiempo de evolución de la retinopatía diabética. Los pacientes fueron clasificados clínicamente mediante el protocolo de ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study). El grupo control estuvo conformado por 49 diabéticos tipo 2 con 13 años o más de diabetes y que no presentaban retinopatía diabética de acuerdo al ETDRS. En ambos grupos, fueron pareados por género, se investigaron variables como tratamiento actual, antecedentes familiares de retinopatía diabética o de nefropatía diabética, coexistencia de enfermedades crónico-degenerativas, entre otras.

Metodología

En todos los casos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 incluidos en el estudio se realizaron los siguientes procedimientos:

1. Historia clínica oftalmológica completa (determinación de capacidad visual, biomicroscopía y fundoscopia)
2. Determinación de glucosa y hemoglobina glucosilada
3. Aislamiento de DNA

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron en frecuencias simples y porcentajes. Para cada variante específica se efectuó una prueba de χ^2 para identificar significancia estadística. Se consideraron valores significativos de P aquellos <0.05 . La determinación de la razón de momios o razón de probabilidades (odds ratio) para cada variante o haplotipos específicos se realizará por medio de tablas de contingencia de 2 x 2 y utilizando el software OpenEpi®.

VII.

ASPECTOS ÉTICOS

- 1.** El paciente fue informado sobre las características y objetivos del estudio, con el compromiso de manejar confidencialmente la información.
- 2.** Se informó a todos los pacientes que la muestra sanguínea será utilizada exclusivamente con fines de análisis de DNA y mapeo de la enfermedad en estudio.
- 3.** Los pacientes previa información del protocolo firmaron la carta de consentimiento informado.
- 4.** El presente estudio cumple con los requisitos de la Declaración de Helsinki, el reglamento General de Salud en Materia de Investigación en Salud y las normas de procedimientos del Comité de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

VIII.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron:

Tabla de pacientes:

# DNA	ID	rs699549			rs10501943		
		C/C	C/T	T/T	T/T	T/C	C/C
2322	AMP	1			1		
2333	HOE	1			1		
2371	ICP	1			1		
2372	CJE			1	1		
2373	DMMF	1			1		
2374	OGJ	1				1	
2375	CAC	1			1		
2389	TGI	1				1	
2390	BHMG	1			1		
2391	FBE	1			1		
2392	GHME	1			1		
2393	MBC	1			1		
2394	JBE	1				1	
2396	CGA	1			1		
2414	CLH	1				1	
2423	RPG	1				1	
2429	MMA	1			1		
2433	MPJ	1			1		
2434	RBML	1			1		

2435	VVAA	1		1	
2436	GBR	1		1	
2437	GFC	1		1	
2438	HEM	1		1	
2439	PCE	1		1	
2440	MGE		1	1	
2441	PGMC	1			1
2442	TGA	1			1
2443	PDJ	1		1	
2444	FSJL	1			1
2445	VME	1			1
2446	GLP	1		1	
2447	RGEA	1		1	
2448	LVB	1		1	
2449	EGML	1		1	
2450	BHE	1		1	
2451	ARV	1		1	
2452	RVM	1		1	
2453	CGA	1			1
2454	CPV	1		1	
2455	SME	1		1	
2456	CRS	1		1	
2457	CGE	1			1
2458	ART	1			1
2459	TEI	1		1	
2460	SRAA	1		1	
2461	SSJ	1		1	
2462	HCA	1		1	

2463	NCR	1			1		
2464	CHO	1			1		
2465	DMF	1			1		
2466	VPR		1		1		
2467	BMMA	1			1		
2468	RAE	1			1		
2469	HFMJ	1			1		
2484	ZHB	1			1		
2485	VTE	1			1		
2486	PVG	1			1		
2487	RGG	1			1		
2492	LDT	1			1		
2511	CLJ	1			1		
2512	TGE	1				1	
2514	RAM	1			1		
2516	DNR	1				1	
2517	AAC		1		1		
2520	NZLF	1			1		
2521	OSJ	1			1		
2522	FBMA		1		1		
2527	JBS	1				1	
2528	DPMS	1			1		
2531	PRJ	1			1		
2536	RRR	1			1		
2542	GMG	1				1	
2545	MIJ	1			1		
T	73	68	4	1	57	16	0

Tabla de controles:

# DNA	ID	rs699549			rs10501943		
		C/C	C/T	T/T	T/T	T/C	C/C
2413	AMC	1			1		
2474	CCP	1			1		
2475	MPE	1			1		
2476	LDM	1			1		
2477	CCL	1			1		
2478	BJM	1			1		
2488	TMG		1		1		
2489	TGME	1			1		
2490	ORJ	1				1	
2491	HRI	1			1		
2493	RTE	1			1		
2494	ACA	1			1		
2495	JSMT	1				1	
2496	LPC	1			1		
2497	GAMC	1			1		
2498	MCA	1			1		
2499	NMME	1				1	
2500	EDJ		1		1		
2501	ARE	1			1		
2502	HVH		1		1		
2503	LMM	1			1		
2504	NJMI	1				1	
2505	LLE	1				1	
2506	LAJ	1			1		
2507	CVR	1			1		

2508	GCP	1				1		
2509	PTA	1				1		
2510	VLE	1				1		
2513	SVG	1					1	
2515	RAJ	1				1		
2518	LDMC	1				1		
2519	PRG	1				1		
2523	NAE	1						1
2524	MTMG	1					1	
2525	GMMS	1				1		
2426	GJT		1			1		
2529	ATE	1				1		
2530	GMC	1				1		
2532	VDR	1				1		
2540	PPE	1				1		
2543	CPF	1					1	
2546	HOY	1				1		
2547	ATA	1				1		
2548	VCA	1				1		
2549	OMG		1			1		
2552	AUC		1			1		
2561	LSBG	1				1		
2571	MCGR	1					1	
2573	CAMG	1				1		
T	49	43	6	0		39	9	1

Análisis.

Se realizó un análisis estadístico en el software de OpenEpi que indicó que no existen diferencias significativas entre casos y controles en las frecuencias alélicas ni genotípicas de los dos polimorfismos analizados. A continuación se muestran los resultados del análisis estadístico tanto para los genotipos como para las frecuencias alélicas de las variantes estudiadas.

rs699549

ANÁLISIS POR FRECUENCIA GENOTÍPICA

CC: p 0.33; OR: 1.89 IC [0.54 – 6.6]

CT: p 0.18; OR: 0.41 IC [0.099 – 1.6]

ANÁLISIS POR FRECUENCIA ALÉLICA

C: p 0.4760; OR: 1.5 IC [0.45 – 5.12]

T: p 0.4760; OR 0.65 IC [0.195 – 2.2]

rs10501943

ANÁLISIS POR FRECUENCIA GENOTÍPICA

TT: p 0.99; OR: 0.91 IC [0.36 – 2.29]

ANÁLISIS POR FRECUENCIA ALÉLICA

CC: p ; OR: IC [] (calculado con 0.5)

T: p 0.9483; OR: 1.02 IC [0.442 – 2.32]

C: p 0.9483; OR 0.97 IC [0.429 – 2.26]

DISCUSIÓN

La diabetes mellitus se considera un problema de salud, en el hemisferio occidental y la retinopatía diabética, una de sus complicaciones más frecuentes, es la causa mas común de ceguera en población en edad productiva; se ha estimado que cada año se diagnostican 5800 casos nuevos de ceguera legal debido a retinopatía diabética. Por otra parte, el 25% de la población diabética mundial padece algún grado de retinopatía diabética y el 5% tiene un grado avanzado de la misma. La identificación de variantes genéticas que eleven el riesgo de padecer retinopatía diabética en nuestra población, permitirá identificar precozmente a sujetos en riesgo y establecer programas de tratamiento y monitorización mas agresivos para evitar tal complicación. Recientemente se demostró en una población Mexico-Americana que los polimorfismos rs10501943 y rs699549 elevan entre 2 y 3.5 veces el riesgo de desarrollar retinopatía diabética.

En esta muestra, que incluyó 73 pacientes con retinopatía diabética y 49 diabéticos de larga evolución sin retinopatía diabética, no se identificó que estos 2 polimorfismos confirieran un riesgo elevado para desarrollar la complicación. A pesar de que el tamaño de muestra es reducido, los controles utilizados son sujetos con diabetes de larga evolución sin datos de retinopatía diabética, lo que aporta mayor fortaleza al estudio. Estos datos indican que los factores genéticos de riesgo para retinopatía diabética en población Mexico-Americana son diferentes a los de población Mexicana.

CONCLUSIONES

- 1.- A nuestro conocimiento, este es el primer estudio de asociación para identificar alelos de riesgo para retinopatía diabética realizado en población Mexicana

- 2.- Se eligieron los polimorfismos rs10501943 y rs699549 debido a que éstos fueron identificados recientemente en población Mexico-Americana como alelos de riesgo alto para retinopatía diabética.

- 3.- En esta muestra, que incluyó 73 pacientes con retinopatía diabética y 49 diabéticos de larga evolución sin retinopatía diabética, no se identificó que estos 2 polimorfismos confirieran un riesgo elevado para desarrollar la complicación.

- 4.- A pesar de que el tamaño de muestra es reducido, los controles utilizados son sujetos con diabetes de larga evolución sin datos de retinopatía diabética, lo que aporta mayor fortaleza al estudio.

- 5.- Estos datos indican que los factores genéticos de riesgo para retinopatía diabética en población Mexico-Americana son diferentes a los de población Mexicana.

- 6.- Este estudio servirá de base para futuros estudios de búsqueda de factores genéticos de riesgo para retinopatía diabética en México utilizando estrategias novedosas como el análisis de variantes en genoma completo.

REFERENCIAS

1. Wild S, Roglic G, Green A, King H, Sicree R. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27:1047 – 1053.
2. Diabetes American Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2002. *Diabetes Care*, 2003; 26(3): 917 – 932.
3. Diabetes American Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes Care*, 2008; 31(3): 596 – 615.
4. Rodríguez Bolaños RA, Reynales Shigematsu LM, Jiménez Ruíz JA, Juárez Márquez SA, Hernández Ávila M. Costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de microcosteo. *Rev Panam Salud Publica*. 2010; 28(6): 412 – 420.
5. Olaiz-Fernández G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, López M, Hernández M, Tapia R, Sepúlveda J, ENSA 2000, Cuernavaca México: INSP, 2000.
6. Aguilar-Salinas CA, Velazquez Monroy O, Gómez-Pérez FJ, Gonzalez Chavez A, Lara Esqueda A, Molina Cuevas V, Rull-Rodrigo J, Tapia Conyer R for the ENSA 2000 Group. Characteristics of the patients with type 2 diabetes in Mexico: results from a large population-based, nation-wide survey. *Diabetes Care* 2003; 26: 2021 – 6.
7. Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
8. Dr. Rodrigo Álvarez N. Retinopatía diabética. *Boletín de la escuela de medicina*; Volumen 31(3), 2006.
9. Resnokoff S et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, 2004, 82: 844 – 851.
10. Klein R et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Archives of Ophthalmology*, 1984, 102: 520 – 526.

11. Klein R et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Archives of Ophthalmology*, 1984, 102: 527 – 532.
12. Pablo Olmos et al. Fisiopatología de la retinopatía y nefropatía diabéticas. *Rev med chile* 2009; 137: 1375 – 1384.
13. Donald S Fong, Lloyd P. Aiello, Frederick I. Ferris III, Ronald Klein. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*; October 2004, 27(10): 2540 – 2553.
14. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS Research group. *Ophthalmology* 1. 1991 May; 98: 766 – 785.
15. Sheila K. West, Ronald Klein, Jorge Rodriguez, Beatriz Muñoz, Aimee T. Broman, Rosario Sanchez, Robert Snyder. Diabetes and Diabetic Retinopathy in a Mexican-American Population. *Diabetes Care*; 2001, 24: 1204 – 1209.
16. Leslie, R.D and Pyke, D.A. Diabetic retinopathy in identical twins, *Diabetes*; 1982, 31: 19 – 21.
17. Satagopan Uthra, Rajiv Raman, Bickol N Mukesh, Rani Padmaja Kumari, Tarum Sharma, Catherine A McCarty, Govinadasamy Kumaramanickavel. *Int J Gener*; 2008, 8(1-2): 155 – 159.
18. Michael A. Grassi, Anna Tikhomirov, Sudha Ramalingam, Jennifer E. Below, Nancy J. Cox, Dan L. Nocolae. Genome-wide meta-analysis for severe diabetic retinopathy. *Human Molecular Genetics*; 2011, 20(12): 2472 – 2481.
19. G. Imperatore, R. L. Hanson, D. J. Pettitt, S. Kobes, P. H. Bennett, and W. C. Knowler, Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with 2 diabetes. *Diabetes*, 1998, Vol. 47, no. 5, pp. 821 – 830.
20. D. M. Hallman, E. Boerwinkle, V. H. Gonzalez, B. E. K. Klein, R. Klein, and C. L. Hanis. A genome-wide linkage scan for diabetic retinopathy susceptibility genes in Mexican Americans with type 2 diabetes from Starr County, Texas. *Diabetes*; 2007 vol. 56, no. 4, pp. 1167 – 1173.
21. Yi-Ping Fu, D.Michael Hallman, Victor H. Gonzalez, Barbara E.K.Klein, Ronald Klein, M.Geoffrey Hayes, Nancy J.Cox, Graeme I.Bell, Craig L.Hanis. Identification of Diabetic Retinopathy Genes through a Genome-Wide Association Study among Mexican-Americans from Starr County, Texas. *Journal of Ophthalmology*. 2010; 9 pages.
22. Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1991 May;98:823-33