



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“Polimorfismo -106C>T del gen *AKR1B1* en
pacientes con retinopatía diabética”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Yutzil Idalid Reyes Morales

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Héctor Javier Pérez Cano



Ciudad Universitaria, CD. MX, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Luz María del Rocío Valdés Gómez

VOCAL: Héctor Javier Pérez Cano

SECRETARIO: Alberto Ortega Vázquez

1er SUPLENTE: Javier Axosco Marín

2° SUPLENTE: Lizbeth Esmeralda García Velázquez

SITIO DÓNDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Centro de Investigación Biomédica, Fundación Hospital Nuestra señora de la Luz

AGRADECIMIENTO

A la unidad del Centro de Investigación Biomédica de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, por prestar sus instalaciones y recursos, para la realización de este proyecto.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Héctor Javier Pérez Cano _____

SUSTENTATE

Yutzil Idalid Reyes Morales _____

ÍNDICE

TABLA DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	2
Diabetes mellitus.....	2
Definición.....	2
Características.....	3
Prevalencia.....	4
Complicaciones	5
Retinopatía diabética (RD)	7
Definición.....	7
Características.....	7
Prevalencia.....	7
Factores de riesgo.....	9
Fisiopatología	10
Clasificación de la retinopatía diabética.....	12
Gen <i>AKR1B1</i> y relación con RD	15
Gen <i>AKR1B1</i>	16
Localización y estructura	16
Variante rs759853 (g.-106C>T)	17
Función.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
Extracción de ADN	20
Reacción en Cadena de la Polimerasa del gen <i>AKR1B1</i>	21
Electroforesis	22
Secuenciación	23
Análisis estadístico	23
RESULTADOS.....	24

DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
CONCLUSIONES	35
GLOSARIO	36
REFERENCIAS	40
ANEXO A. Consentimiento informado.....	42

TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AGE	Productos finales de glicosilación avanzada
AR	Aldosa reductasa
DM	Diabetes Mellitus
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético.
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
IGF	Insulina como factor de crecimiento
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido forma oxidada
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NOM	Norma Oficial Mexicana
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PKC	<i>Protein cinasa C</i>
RAGE	Receptor de productos de glicosilación avanzada
RD	Retinopatía diabética
RDNP	Retinopatía diabética no proliferativa
RDP	Retinopatía diabética proliferativa
RDPP	Retinopatía diabética pre-proliferativa
SNP	Variante de un solo nucleótido
TNF	Factor de necrosis tumoral

INTRODUCCIÓN

Diabetes mellitus

Definición

De acuerdo con la **NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus**. Se define como diabetes mellitus (DM) a la enfermedad sistémica crónico-degenerativa, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales. Clasificándola como un grupo complejo de desórdenes metabólicos. (Crawford, 2017).

Se considera un caso confirmado de DM a la persona cuyo diagnóstico se corrobora por medio de estudios de laboratorio: cuando se presenta una glucemia plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dl; una glucemia plasmática casual ≥ 200 mg/dl; o bien una glucemia ≥ 200 mg/dl a las dos horas después de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua, por otra parte, pueden presentar una HbA1c mayor a 6.5%, criterios diagnósticos de DM que se encuentran en el Sistema Nacional de Salud. (NOM-015-SSA2-2010, 2018).

Por otro lado, existen individuos que presentan “prediabetes”, los cuales aún no desarrollan la enfermedad debido a que no cumplen los criterios antes señalados, sin embargo, poseen un mayor riesgo de desarrollar DM tipo 2 en un futuro, dichos individuos cuentan con niveles plasmáticos de glucosa dentro del intervalo de 100-125 mg/dl o pueden presentar una HbA1c dentro del intervalo de 5.7-6.4%. (Kharroubi & Darwish, 2015)

Características

Se caracteriza por una hiperglucemia crónica resultado de la deficiencia en la secreción de la insulina, acción de la insulina o ambos, lo que provoca anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas resultado de la importancia que presenta la insulina como hormona anabólica. (Kharroubi & Darwish, 2015).

En la mayoría de los casos de DM, su etiopatogenia recae en dos categorías: En la primera categoría, DM tipo 1, la causa es una absoluta deficiencia en la secreción de insulina, producida por una destrucción de las células β del páncreas debido a un proceso autoinmune. La destrucción autoinmune de las células β tiene múltiples predisposiciones genéticas, así como también está relacionada con factores medio ambientales que hasta la fecha no se han elucidado por completo. Los pacientes pueden ser de cualquier edad, casi siempre delgados y suelen presentar comienzo abrupto de signos y síntomas con insulinopenia antes de los 30 años de edad. (American Diabetes Association, 2014)

En la segunda categoría, DM tipo 2, la causa es una combinación de la resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta compensatoria en cuanto a la producción de insulina. Los pacientes suelen ser mayores de 30 años cuando se hace el diagnóstico, son obesos y presentan síntomas clásicos tales como: poliuria, polidipsia, polifagia, así como pérdida de peso. (American Diabetes Association, 2014). Finalmente, en la última categoría se encuentra la DM gestacional la cual se define como la alteración en el metabolismo de los carbohidratos que se detecta por

primera vez durante el embarazo, ésta se traduce en una insuficiente adaptación a la insulinoresistencia que se produce en la gestante. (Crawford, 2017)

A pesar de los avances en la información a nivel celular y molecular de esta enfermedad, el mecanismo del desarrollo de la DM y sus complicaciones todavía no se comprende del todo. (Kharroubi & Darwish, 2015).

Prevalencia

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS); En el mundo existen más de 347 millones de personas con DM, en donde la DM tipo 2 representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Así mismo, la retinopatía diabética (RD) es una causa importante de ceguera. Al cabo de 15 años con DM, aproximadamente un 2% de los pacientes pierden por completo la vista y un 10% sufren un deterioro grave de la visión. (Federación Mexicana de Diabetes , 2018)

Los pacientes con DM tienen un riesgo de 4 a 5 veces más a desarrollar enfermedades cardiovasculares en comparación con individuos que no cuentan con esta enfermedad y éstas son la principal causa de muerte en pacientes con DM tipo 1 y DM tipo 2. (Pereira, 2015)

Por otra parte, de acuerdo con la Federación Mexicana de Diabetes; en México la DM se encuentra dentro de las primeras causas de muerte, en donde de acuerdo con resultados de la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportada en el 2012, 4 millones de personas refirieron haber sido diagnosticadas con DM, siendo el 90% de los casos relacionados con sobrepeso y obesidad. Así mismo de la

proporción de adultos con diagnóstico previo de diabetes, poco más del 80% recibe tratamiento y solo el 25% presentó evidencia de un adecuado control metabólico (1 de cada 4 personas). Siendo la visión disminuida, la complicación más reportada (47.6%) (Federación Mexicana de Diabetes , 2018)

Complicaciones

La DM es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades al corazón, infartos, enfermedad periodontal, daño al sistema nervioso, un incorrecto funcionamiento de los riñones, así como enfermedades periféricas vasculares. (Pereira, 2015)

Dentro de las **complicaciones metabólicas agudas**, resultado del déficit absoluto o relativo de la insulina, se encuentra un cuadro de cetoacidosis diabética y el síndrome hiperglucémico hiperosmolar. (Umpierrez, 2016)

La cetoacidosis diabética es caracterizada por una triada la cual se conforma de una hiperglicemia (250-600 mg/dL de glucosa), cetosis y acidosis metabólica. Todo esto resultado de una deficiencia relativa o absoluta de insulina y un exceso de hormonas reguladoras tales como glucagón, cortisol, catecolaminas y hormonas del crecimiento que conducen a hiperglicemia, glucosuria, deshidratación e hiperosmolaridad. (Tran, 2017) , presentándose, en mayor medida, en pacientes con DM tipo 1 que en pacientes con DM tipo 2, aunque también éstos últimos pueden presentarla. (Tran, 2017)

Por otra parte, el síndrome hiperglucémico hiperosmolar se considera la complicación más grave y más común en pacientes con DM tipo 2, el cuál es

caracterizado por una hiperglucemia severa (600-1200 mg/dL de glucosa), hiperosmolaridad y deshidratación, en donde la tasa de mortalidad se estima ser mayor al 20%, siendo 10 veces mayor a la tasa de mortalidad presentada por la cetoacidosis diabética. (Pasquel, 2014)

Por otro lado, dentro de las complicaciones provocadas por presentar una hiperglucemia crónica se encuentran las asociadas a daños a largo plazo, provocadas por el mal funcionamiento de los vasos sanguíneos pequeños y largos, resultando entonces en el fallo de varios órganos, no siendo la intensidad y duración de la hiperglucemia los únicos factores determinantes para la aparición de dichas complicaciones, en cuyo desarrollo intervienen también otros factores de riesgo como lo son la hipertensión arterial, dislipidemia, tabaquismo, causas genéticas, entre otras aún no elucidadas. (Pereira, 2015)

Las **complicaciones crónicas** de la diabetes se clasifican en:

a) **Macrovasculares:** (equivalente a aterosclerosis) que son las que afectan a las arterias en general pudiendo provocar enfermedad cardíaca coronaria, cerebrovascular y vascular periférica, siendo las repercusiones de las complicaciones macrovasculares las causantes de un incremento de 3 a 4 veces en la morbimortalidad cardiovascular, constituyendo la principal causa de muerte en los diabéticos (Pereira, 2015)

b) **Microvasculares:** asociadas a un mal funcionamiento de los microvasos, los cuales son la unidad básica funcional del sistema cardiovascular que comprende arteriolas, capilares sanguíneos y vénulas. La diferencia que presentan en

comparación con los macrovasos, los cuales proveen de sangre a los órganos, es que los microvasos juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la presión sanguínea y la entrega correcta en el organismo de los nutrientes correspondientes. Por lo que la DM induce cambios en la microvasculatura, afectando arteriolas, glomérulos, retina, miocardio, piel y músculo, induciendo a su vez problemas clínicos tales como: nefropatía, neuropatía, enfermedades cardiovasculares y finalmente retinopatía diabética. (Chawla, 2016)

Retinopatía diabética (RD)

Definición

La RD es la principal causa de ceguera en adultos con edad productiva (entre 16-64 años de edad), en países como los Estados Unidos de América y en México. Se trata de una enfermedad progresiva y asintomática hasta los estadios avanzados, como resultado de un daño vascular que se caracteriza por aumento de permeabilidad y daño capilar atribuyéndolo a mantener una hiperglucemia crónica como una de las causas principales (Tenorio, 2010)

Características

Prevalencia

La RD puede ocurrir tanto en pacientes con DM tipo 1 como en pacientes con DM tipo 2. Estudios clásicos de epidemiología en el campo de la oftalmología tales como los de WESDR (Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy) proveen datos detallados acerca de la prevalencia de la retinopatía diabética proliferativa (RDP), caracterizada por la neovascularización, así mismo considerada como la

etapa más grave de retinopatía diabética y la retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) primera etapa que se presenta en la RD en dónde se observa la presencia de microaneurismas, hemorragias intrarretinales, así como de exudados duros, de tal forma que WESDR reporta que aproximadamente 75% de la población con DM desarrolla RD después de 10 años de ser diagnosticados con DM, y de esos pacientes con RD aproximadamente dos tercios desarrollan estadios más severos de dicha enfermedad, desarrollando el 20% de dichos pacientes RDP. (Wong, 2016)

De acuerdo con datos estadísticos de la federación mexicana de DM, A.C. la RD es la tercera causa de ceguera irreversible en el mundo y la primera causa en personas en edad productiva (16-64 años) en países en vías de desarrollo. Las personas con esta enfermedad representan el 5% de los 37 millones de ciegos del mundo. De los pacientes con DM el 10% tienen limitación visual y el 2% llegan a la ceguera. (Federación Mexicana de Diabetes , 2018)

Finalmente es importante señalar que la prevalencia de la DM está aumentando debido a la mayor sobrevivencia y el cambio en el estilo de vida de la población, llegando incluso a más del 10% en algunos países. Se estima que, en 20 años, 90% de los casos de DM tipo 1 y 60% del tipo 2, tendrán alguna forma de retinopatía y de ellas, 5% requerirá tratamiento para evitar una ceguera irreversible, esto, a pesar de que la RD es prevenible en un 80% de los casos a una temprana detección (Federación Mexicana de Diabetes , 2018)

Factores de riesgo

Los factores de riesgo más consistentes para el desarrollo de la RD, son una larga duración de la DM, hiperglucemia e hipertensión. Sin embargo, existe una gran variación en el comienzo y desarrollo de la RD que no puede ser explicada ni con la hiperglucemia ni con la hipertensión. (Wong, 2016)

En un estudio de casos-controles basados en datos pertenecientes a 240 individuos (80 casos y 160 controles) realizados en una clínica especializada de la Universidad de Santa Catarina, Brasil, en donde evaluaron características demográficas, control metabólico y comorbilidades, presentaron hallazgos que muestran que es probable que el género, edad y masa corporal no sean factores de riesgo que se asocien al desarrollo de la RD. Sugiriendo, sin embargo, un monitoreo regular de estos pacientes. Así mismo, el estudio sugiere, que los individuos con un control glicémico pobre son más propensos a desarrollar RD, observando de igual forma una relación positiva en cuanto a la duración de la DM y el desarrollo de la RD. Teniendo como conclusión que pacientes con diabetes después de 10 años de padecer dicha enfermedad con un bajo control de niveles de glucosa y nefropatía presentan una mayor probabilidad de desarrollar RD. (Carriero, 2016)

Sin embargo, en algunos otros estudios se ha visto que una proporción de pacientes, con un control tanto glicémico como de presión sanguínea pobre, no desarrollan RD. Por otra parte, se ha visto que pacientes con un apropiado control de dichos niveles han desarrollado RD hasta llegar a etapas más severas, sugiriendo la posibilidad de que existan otros factores de riesgo. (Wong, 2016)

El descontrol glicémico que se presenta tanto en la pubertad como en el embarazo también es conocido por ser factor de riesgo para desarrollar RD. Por una parte, dentro de los riesgos con los que se asocia el embarazo están el incremento de los niveles de glucosa y otros involucrados como la hipertensión y la pre-eclampsia. Por otra parte, existe una fuerte razón fisiopatológica la cual sugiere que la dislipidemia puede ser un factor de riesgo, además de otros factores como la nefropatía, obesidad y anemia. (Wong, 2016)

En términos de factores genéticos, se ha reportado una heredabilidad estimada entre 25-50% en pacientes con DM tipo 1, los cuales desarrollaron RDP. Mecanismos epigenéticos (como metilación de DNA, modificación de cromatina de histonas y RNA no codificantes) se han sugerido como parte de la patogénesis de la RD. (Wong, 2016)

Fisiopatología

Debido a la incapacidad de la utilización de la glucosa por rutas metabólicas comunes, las vías metabólicas que se desencadenan, debido a una hiperglucemia en pacientes con DM, son: incremento en la ruta de poliol, el incremento de la producción de productos finales de glicosilación avanzada (AGE), así como la activación anormal de cascadas de señalización tales como la activación de la ruta de la proteincinasa K (PKC) lo cual contribuye al incremento en el estrés oxidativo incrementando entonces el daño en nervios periféricos. (Figura 1) (Wong, 2016)

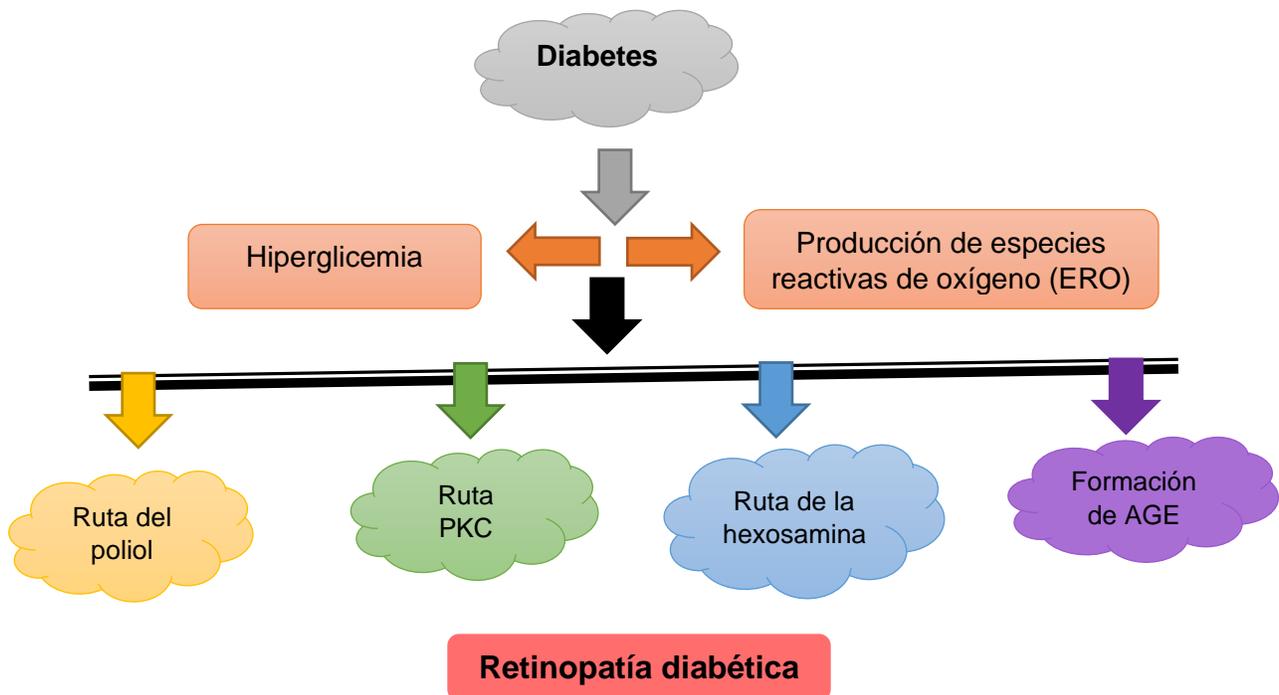


Figura 1. Los cuatro mecanismos involucrados en el desarrollo de la retinopatía diabética son el incremento en la ruta de poliol, el incremento en la formación de AGE, activación de la PKC, así como incremento en la ruta de hexosamina, todas ellas activadas en pacientes con diabetes que mantienen una hiperglicemia crónica, teniendo adicionalmente como resultado el incremento del estrés oxidativo. Zaman, S. (2014). Molecular Mechanisms of Diabetic Retinopathy, General Preventive Strategies, and Novel Therapeutic Targets. *BioMed Research International*, 1-18.

Todas las rutas antes mencionadas de alguna manera incrementan el estrés oxidativo, la inflamación, así como la oclusión vascular, causando irregularidades en factores como: la insulina como factor de crecimiento (IGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral (TNF) por mencionar algunos, los cuales contribuyen eventualmente a la patogénesis de la RD. (Figura 2) (Zaman, 2014).

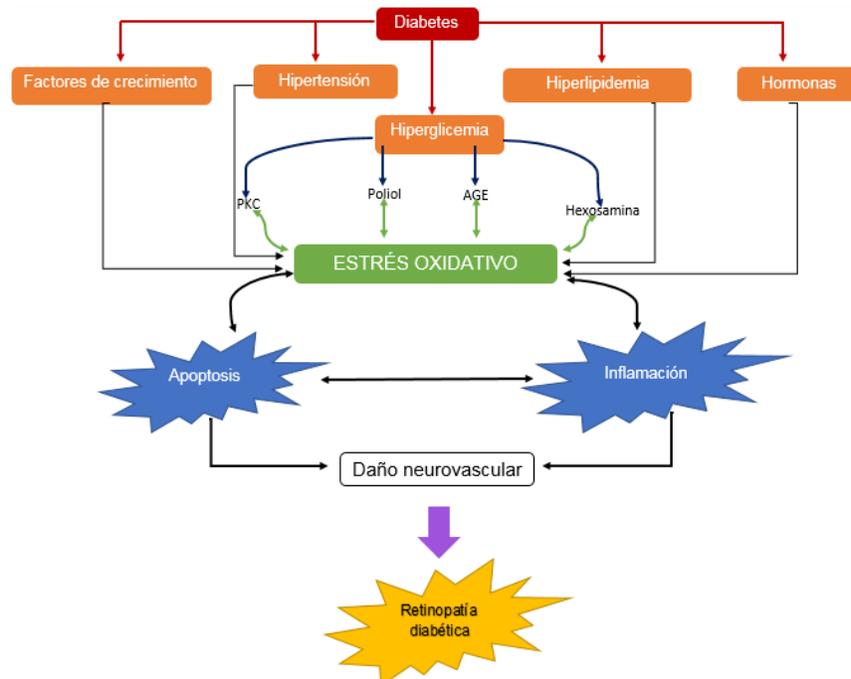


Figura 2. La hiperglucemia induce alteraciones bioquímicas, teniendo como resultado final un incremento en el estrés oxidativo, conduciendo entonces a complicaciones diabéticas, las cuales incluyen apoptosis e inflamación, las cuales contribuyen a la producción de daño neurovascular propiciando así el desarrollo de la retinopatía diabética. Zaman, S. (2014). Molecular Mechanisms of Diabetic Retinopathy, General Preventive Strategies, and Novel Therapeutic Targets. *BioMed Research International*, 1-18.

Un gran número de estudios han descrito algunos mecanismos bioquímicos que expliquen el desarrollo de la RD, sin embargo, todavía no se cuenta con un mecanismo bien establecido. Una de las características distintivas del desarrollo de la RD incluye la pérdida de pericitos, lo que se cree es responsable de la distensión de la pared capilar y de la ruptura de la barrera hematorretiniana, con salida de los componentes del plasma hacia la retina.

Clasificación de la retinopatía diabética.

En términos clínicos, la RD se clasifica como retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) retinopatía diabética pre-proliferativa (RDPP) y retinopatía diabética proliferativa (RDP). (Figura 3).

La RDNP usualmente aparece en la primera o segunda década de la DM, es caracterizada por un incremento en la permeabilidad vascular, presencia de microaneurismas, hemorragias intrarretinales, así como presencia de exudados duros en retina. (Figura 4). (Kaur, 2016)

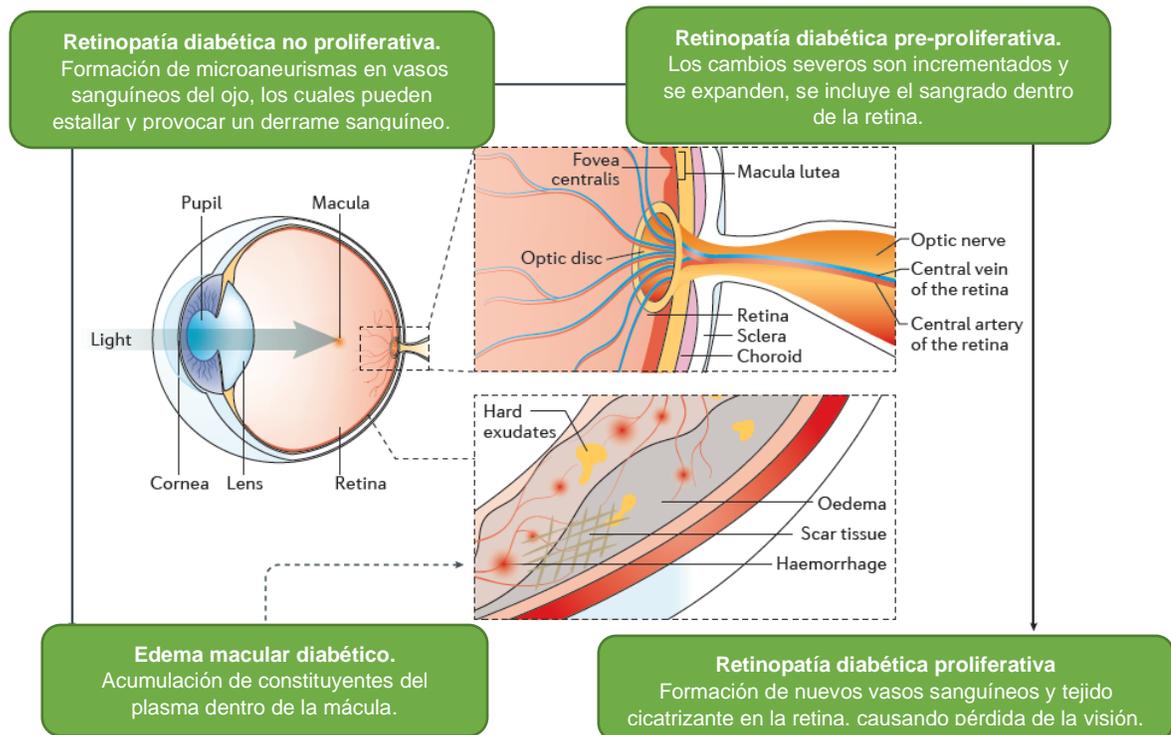


Figura 3. **Etapas clínicas de la retinopatía diabética.** La primera etapa que se puede identificar con una oftalmoscopia es la retinopatía diabética no proliferativa, en donde se observa la presencia de microaneurismas los cuales pueden estallar y permitir el derrame de sangre. El edema macular diabético puede ser considerado como un subtipo particular de RD no proliferativa en donde el derrame involucra la mácula. Por otra parte, la RD pre-proliferativa, se caracteriza por encontrar en una oftalmoscopia la presencia de manchas algodonosas e intrarretinales anormalidades. Finalmente, la retinopatía diabética proliferativa es considerada la etapa más grave, se caracteriza por la formación de nuevos vasos periféricos y tejido cicatrizado en la retina, causando la pérdida de la visión. Wong, T. (2016). Diabetic retinopathy. *Nature reviews/Disease Primers*, 1-17. Figura modificada.

Por otra parte, la RDPP se caracteriza por la presencia de manchas algodonosas, pérdida de pericitos, así como defectos microvasculares intrarretinales, mientras que la RDP es caracterizada por la neovascularización. (Kaur, 2016)

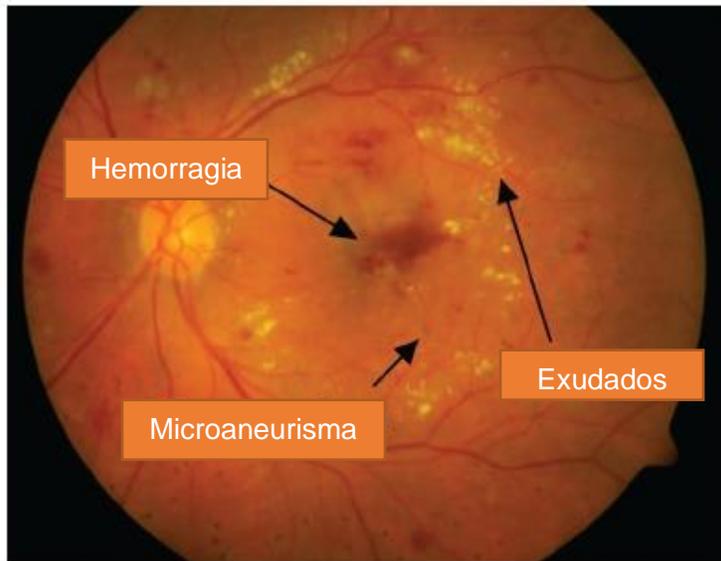


Figura 4. En la **retinopatía diabética no proliferativa**, imagen resultado de una oftalmoscopia, se observa la presencia de microaneurismas, hemorragias intrarretinales, así como la presencia de exudados duros. Rudas, J (2013). Detección de patologías derivadas de las afecciones diabéticas: una revisión del análisis digital de imágenes de retina. *Ingeniería y desarrollo universidad del norte*; 317-325

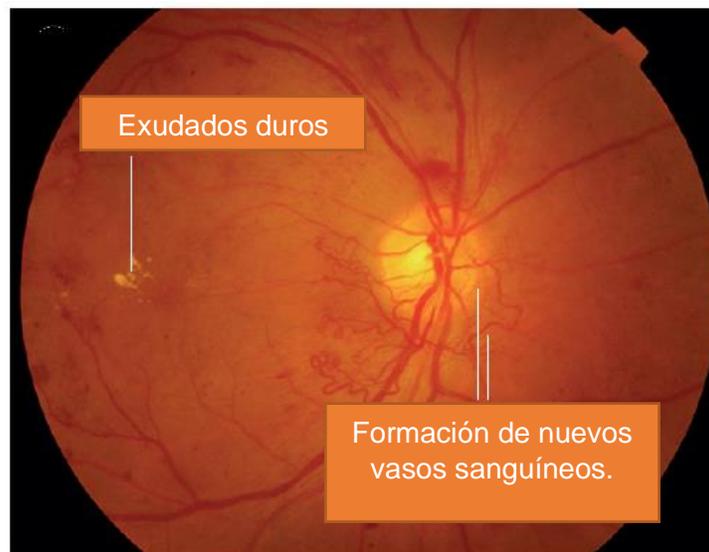


Figura 5. En la **retinopatía diabética proliferativa**, considerada la etapa final de la retinopatía diabética, en imagen resultado de una oftalmoscopia se observa la formación de nuevos vasos sanguíneos Wong, T. (2016). Diabetic retinopathy. *Nature reviews/Disease Primers*, 1-17

En algunos estudios se ha investigado acerca de la asociación que podría tener el rol del gen *AKR1B1* el cuál codifica a la enzima aldosa reductasa, expresado en los pericitos de los capilares retinales, con el desarrollo de la retinopatía diabética. Siendo Kaur, N et al. los autores del primer artículo reportado que confirma con resultados obtenidos de población estudiada en el norte de India la asociación de la variante rs759853 (g.-106C>T) en el gen *AKR1B1* con el desarrollo de retinopatía diabética, en pacientes con DM2. (Kaur, 2016).

Gen *AKR1B1* y relación con RD

El gen *AKR1B1* codifica para un miembro de la superfamilia de aldosas reductasas la cual consiste en más de 40 enzimas y proteínas conocidas. Este miembro cataliza la reducción de un número de aldehídos, incluyendo el aldehído perteneciente a la glucosa y por lo tanto se considera implicado en el desarrollo de las complicaciones diabéticas, catalizando la reducción de glucosa a sorbitol. (Kaur, 2016)

La aldosa reductasa es la enzima limitante de la ruta del polirol, la cual reduce la glucosa en sorbitol, utilizando Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato (NADPH) como cofactor. En algunos tejidos, el sorbitol es oxidado teniendo como resultado fructosa por una enzima que cataliza dicha reacción llamada sorbitol deshidrogenasa (SDH). utilizando NAD⁺ como cofactor. (Kaur, 2016)

En condiciones hiperglucémicas, un incremento en la producción de sorbitol ha reportado una reducción de NADPH. El decremento de NADPH resulta en la reducción de los niveles de glutati6n, un importante antioxidante intracelular, lo cual incrementa la susceptibilidad al estrés oxidativo, es decir, incrementa el

desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (EROS) y los antioxidantes presentes en el organismo, provocando potencial daño tisular. (Hancock, 2001)

Por otra parte, durante la oxidación del sorbitol a fructosa catalizada por SDH, el cofactor NAD^+ , se convierte en NADH, el cual es sustrato de la NADH oxidasa para generar especies reactivas de oxígeno y así elevar el estrés oxidativo. (Figura 6).

(Kaur, 2016)

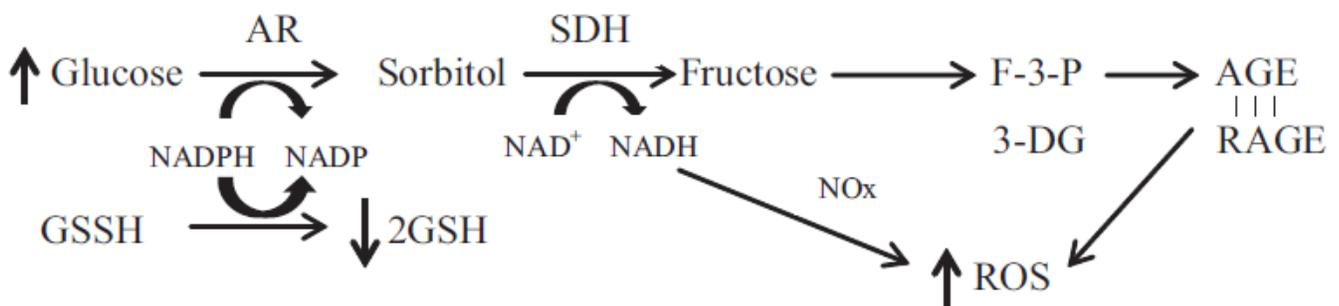


Figura 6. La aldosa reductasa (AR) de la ruta del poliol compite con la glutatión reductasa (GR) por el cofactor NADPH y convierte la glucosa en sorbitol. La fructosa y sus metabolitos, Fructosa 3-fosfato (F-3-P) y 3-desoxiglucosa (3-DG), aceleran el proceso de la formación de AGE. NADH oxidasa (NOx) y la unión de AGE a su receptor RAGE aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual incrementa los niveles de estrés oxidativo. Kaur, N. (2016). *Association of aldose reductase gene (AKR1B1) polymorphism with diabetic retinopathy*. . *Diabetes Research and Clinical Practice*, 41-48.

Gen *AKR1B1*

Localización y estructura

En humanos, *AKR1B1* se localiza en el cromosoma 7q33, con un tamaño cerca de 17 kb. Consiste en 11 exones que codifica para la aldosa reductasa, una proteína de 316 aminoácidos con un peso de 35,858 daltons. (Kaur, 2016) (National Center of Biotechnology Information, 2019)

Variante rs759853 (g.-106C>T)

Algunos estudios han reportado variaciones en nucleótidos, incluyendo rs759853 (g.-106C>T), CA(n) dinucleótido que se repite en la región promotora y la sustitución G>A en la región intergénica en *AKR1B1*, y se han asociado con el desarrollo de complicaciones en la diabetes tanto microvasculares como macrovasculares, tales como la nefropatía diabética y la retinopatía diabética. (Kaur, 2016)

Función

Gen que codifica para los miembros de la superfamilia de la Aldo-ceto reductasa, la cual consiste en más de 40 enzimas y proteínas conocidas. Dentro de sus funciones se encuentran: La catálisis de la reducción NADPH-dependiente de una gran variedad de compuestos que contienen grupos carbonilos a su correspondiente alcohol. Así mismo, muestra actividad catalítica hacia metabolitos endógenos tales como aldehídos aromáticos y alifáticos, cetonas, monosacáridos y ácidos biliares. Enzimas clave en la ruta del poliol, cataliza la reducción de glucosa a sorbitol durante la hiperglucemia. Por otra parte, cataliza la reducción de una gran variedad de aldehídos que componen fosfolípidos tales como: 1-palmitol-2-(5-oxovaleroil)-sn -glicero-3-fosfoetanolamin (POVPC) y aldehídos de fosfolípidos que son generados de la oxidación de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamidas. Finalmente, desempeña un papel en la desintoxicación de carbonos insaturados derivados de la dieta y los lípidos, como el crotonaldehído, 4-hidroxicinena, trans-2-hexenal, trans-2,4-hexadienal y sus carbonilos conjugados de glutatión (GS-carbonilos). (Uniprot, 2019)

JUSTIFICACIÓN

El gen *AKR1B1* está asociado con el desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes tales como la retinopatía diabética. La variante presente en la región promotora del gen *AKR1B1* rs759853 (g.-106C>T) ha sido implicada en la patogénesis de la retinopatía diabética, observando la expresión del gen alterada en población china, chilena, brasileña y japonesa. Se sabe que existe un reporte publicado acerca del análisis de la asociación de la variante rs759853 (g.-106C>T) (*AKR1B1*) con el desarrollo de la retinopatía diabética en población de la India, reporte titulado como: “*Association of aldose reductase gene (AKR1B1) polymorphism with diabetic retinopathy*” escrito por Naudeep Kaur, Vanita Vanita, en India. En el cual, los autores mencionan que la variante génica T, está relacionada con la retinopatía diabética, sin embargo, es necesario realizar estudios en diferentes poblaciones para confirmar el hallazgo.

Por lo anterior se considera importante realizar el análisis de la asociación de la variante rs759853 (g.-106C>T) en el gen *AKR1B1* con el desarrollo de la retinopatía diabética en población mexicana, debido a la alta prevalencia que existe de padecer Diabetes en México, así como de desarrollar RD. De tal forma que sea posible aportar nueva información respecto a las causas que contribuyen al desarrollo de la Retinopatía Diabética y tomar las medidas de prevención correspondientes.

HIPÓTESIS

Si la enzima aldosa reductasa se encuentra asociada al desarrollo de retinopatía diabética, entonces, el cambio a nivel molecular como la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen *AKR1B1* que la codifica, puede estar relacionado como factor de riesgo.

OBJETIVO GENERAL

Investigar la asociación de la variante del gen de la aldosa reductasa *AKR1B1* rs759853 (g.-106C>T) con el desarrollo de la retinopatía diabética en pacientes mexicanos con DM tipo 2.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener muestras de sangre a través de una flebotomía, de pacientes con previo diagnóstico clínico de DM y RD los cuáles serán utilizados como casos, así como de pacientes con diagnóstico de DM sin RD los cuáles serán utilizados como controles.
- Realizar un análisis molecular de la variante del gen *AKR1B1* en pacientes con diabetes tipo 2 con diagnóstico clínico de retinopatía diabética y de un grupo de sujetos sin retinopatía diabética.
- Obtener la secuenciación de la región del SNP rs759853 para determinar la frecuencia genotípica y frecuencia alélica de pacientes y controles.
- Determinar si existe relación entre la frecuencia genotípica y alélica entre pacientes y controles y calcular el riesgo relativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio comparativo, transversal y prospectivo de casos y controles para ver la relación que existe entre la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen *AKR1B1* y la retinopatía diabética, el protocolo fue aprobado por el comité de investigación y ética en investigación de la institución (No. De registro 2017R18R2).

Se reclutaron 26 pacientes cuyos criterios de inclusión fueron: diagnóstico clínico de diabetes mellitus tipo 2 y Retinopatía Diabética, tomados como casos, y 32 sujetos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y sin retinopatía para el grupo control, valorados por el Departamento de retina.

Previa firma de consentimiento informado se obtuvieron muestras de sangre completa a través de una flebotomía, con EDTA como anticoagulante, de los p y casos y controles utilizando sistema **BD Vacutainer**®. Los criterios de exclusión fueron pacientes que tuvieran retinopatía debida a otros factores como la degeneración macular relacionada a la edad y/o que no aceptaran participar en el estudio.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit *QIAamp mini kit*® (*Qiagen*) siguiendo las indicaciones del proveedor.

A 200 µL de la muestra se le adicionó 250µL de la solución de lisis CLS, las muestras fueron incubadas a 56°C/60min, en presencia de 30 µL proteinasa K (1mg/mL) y se agitó en vórtex cada 10min. Posteriormente se adicionó 100 µL de la solución de precipitación para incubar en refrigeración/5 min, las muestras fueron

centrifugadas nuevamente y se decantaron en un nuevo tubo *Eppendorf*® para hacer los lavados con 300 µL de isopropanol, se homogenizo invirtiéndolos 50 veces de manera suave, con una tercera centrifugación por 5 minutos se decantó el sobrenadante y se precipitó con 300 µL etanol al 70% Las muestras se dejaron secar a Temperatura ambiente/12hrs, finalmente se agregó 100 µL de solución de hidratación; el material genético fue almacenado a -20°C hasta su estudio.

Reacción en Cadena de la Polimerasa del gen *AKR1B1*

Se realizó PCR en la región UTR5' del gen aldosa reductasa (*AKR1B1*) cada reacción fue hecha en un volumen total de 20µL conteniendo 10µL de la *HotStarTaq Master MixPolimerase* (*QIAGEN Sciences. Maryland, USA*), (con 2.5 U de Taq polimerasa, 1.5 nM de Mg₂Cl, 200uM de cada dNTP, 1X del buffer de reacción) y 0.3µL de los oligonucleótidos para el gen *AKR1B1* reportados por Kaur y cols (2016). *Forward* 5'CCTTTCTGCCACGCGGGGCGCGGG-3' y *Reverse* 5'CATGGCTGCTGCGCTCCCCAG-3'.

El producto de amplificación esperado es de 263 pb. La amplificación fue realizada utilizando el programa de 1 ciclo a 95°C/10 min, y 35 ciclos a 95°C/1 min, con una Temperatura media de 65.7 °C/1 min seguida de una extensión a 72°C/1min. Finalmente, un ciclo de extensión de 72°C/10minutos. La reacción se realizó en un termociclador *AXYGEN MAXYGENE PCR System 2400* (*Perkin Elmer Co. Norwalk, Connecticut*)

Electroforesis

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 90V durante 40 minutos y se usó como marcador de pesos moleculares el *Track It™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, L.T.)*, a las muestras se les añadió 2 µL de *Gel RedNucleicAcidStain™* de *Biotium* y fueron observados bajo luz ultravioleta utilizando el transiluminador de *UVP BioLite™ MultiSpectralSource* con el programa *Launch Vision Works LS*.

Las bandas con el amplificado fueron cortadas para su posterior purificación utilizando los reactivos de *QIAquick gel extraction kit*. Se colocó la banda a purificar en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le adicionó 400µL del buffer QG, las muestras fueron incubadas a 56°C en baño María por 15min, mezclando en vórtex cada 3 min, se le adicionó 200 µL de Isopropanol y se pasó a una Columna *QIAquick* con tubo colector, que posteriormente se centrifugaron a 1300 RPM/1min y se descargó el sobrenadante para adicionar 500 µL del buffer QG, se concentraron las muestras a 1300 RPM/1min, se descartó el centrifugado y se lavó las muestras con 750 µL de Buffer de PE , se centrifugó a 1300 rpm/1min dos veces descartando el sobrenadante para eliminar el buffer PE, Se pasó la columna *QIAquick* a un tubo *Eppendorf®* nuevo para la adición de 30µL H₂O, después de un incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 1300 RPM/1min y el producto de amplificación obtenido se utilizó para la secuenciación nucleotídica.

Secuenciación

Se realizó secuenciación de Sanger automatizada directa por el método de terminadores fluorescentes (*Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems*) utilizando el programa de temperaturas que incluyen 25 ciclos de desnaturalización a 97°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 50°C por 15 segundos y una temperatura de extensión de 60°C por 4 minutos. El producto obtenido se analizó en un secuenciador 3130 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Las secuencias de DNA obtenidas se compararon con la secuencia del gen reportada en la base de datos www.ensembl.org/index.html.

Análisis estadístico

Se realizó el conteo de los genotipos de ambas variantes para cada individuo y con estos valores se procedió a calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes y controles.

Estas frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas de los pacientes fueron comparadas con la frecuencia de los controles, obteniendo la relación estadística que existe entre el gen silvestre y los genotipos para la variante, utilizando la prueba exacta de Fisher, con el software *GraphPad Prism V.6*, a un nivel de significancia menor a 0.05, así mismo se determinó el riesgo relativo.

RESULTADOS

Datos demográficos de los casos y controles estudiados.

Al estudio ingresaron 26 sujetos considerados como casos y 32 sujetos control, cuyas características se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de características clínicas entre pacientes con DM tipo 2 sin retinopatía diabética tomados como controles y pacientes tanto con DM tipo 2 como con RD.

Características	Controles (n=32)	Pacientes con RD (n=26)	p
Sexo	Hombres 15 (47%) Mujeres 17 (53%)	Hombres 11 (40%) Mujeres 17 (60%)	0.4879
Edad	69.7 (55 a 79) años	65.88 (56 a 79) años	0.4990
Tiempo con DM	19.2 ±7.32 años	18.2 ±7.59 años	0.4892

*Un valor $p \leq 0,05$ fue considerado significativo

Se analizaron 26 muestras de sangre de pacientes diabéticos con diagnóstico clínico de Retinopatía Diabética, y 32 muestras de sangre de pacientes con diabetes que no presentan retinopatía diabética. Se realizó la técnica de PCR para la obtención del gen aldosa reductasa (*AKR1B1*) el cual contiene la variante a estudiar rs759853 (g.-106C>T), obteniendo el producto esperado de 263 pb (Figura 7)

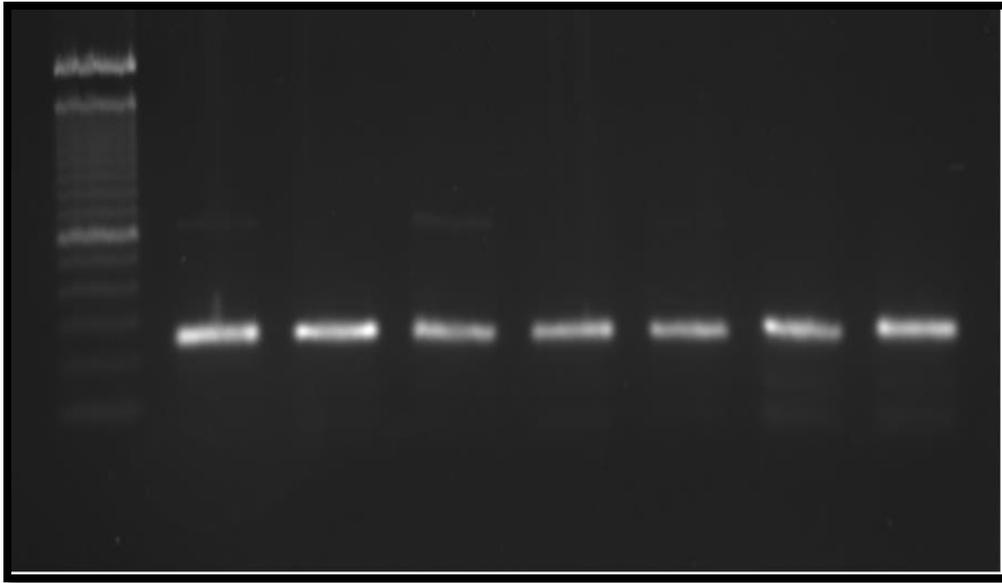
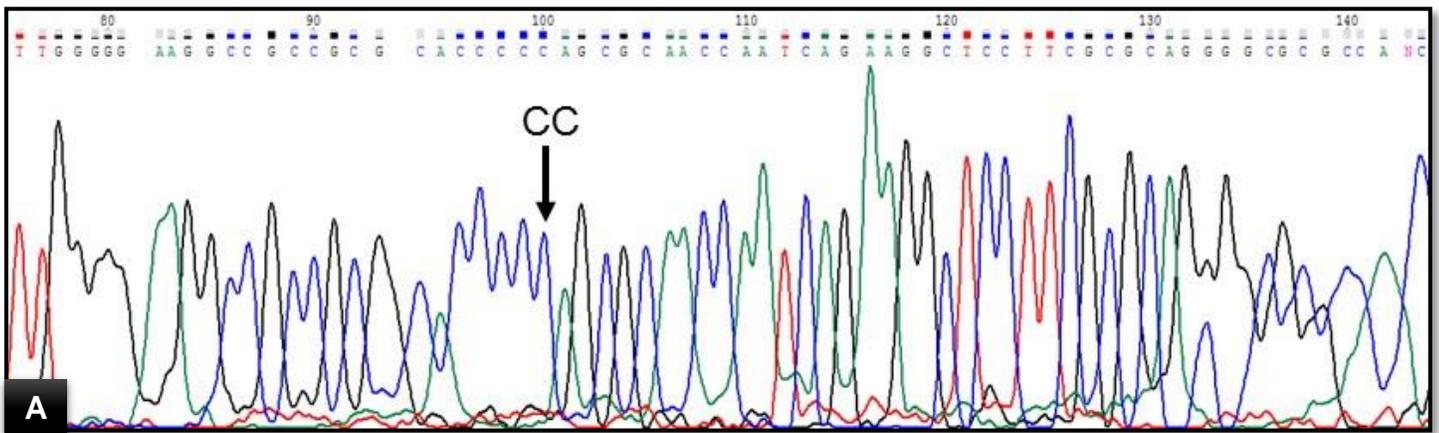
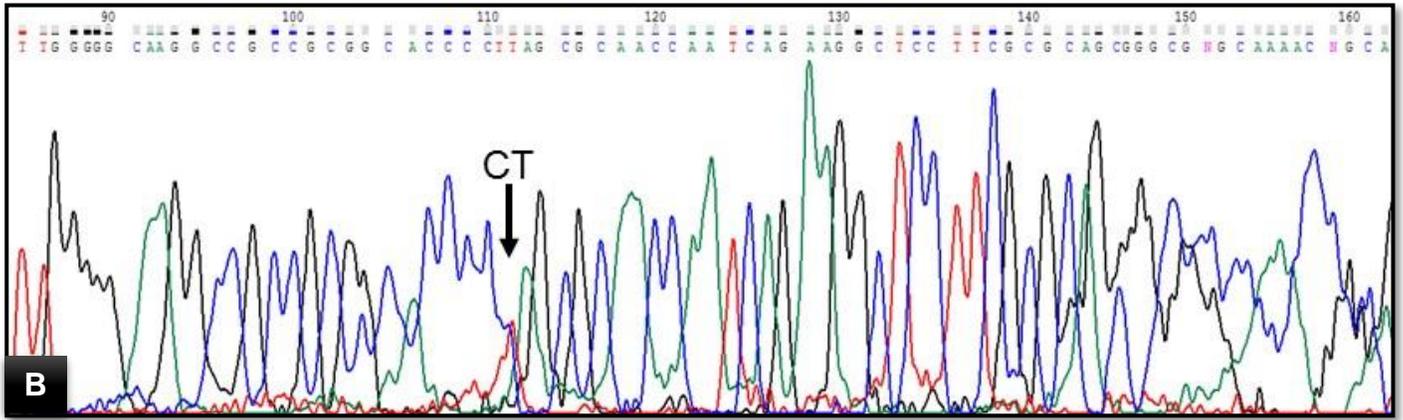


Figura 7. Fotografía tomada con el programa Launch Visión Works LS (transiluminador de UVP BioLite™ MultiSpectralSource) que muestra el producto de amplificación de algunas de las muestras analizadas, en gel de agarosa. El producto corresponde al tamaño esperado de 263pb, este amplificado contiene la región de interés del gen *AKR1B1* para estudiar la variante rs759853(g.-106C>T)

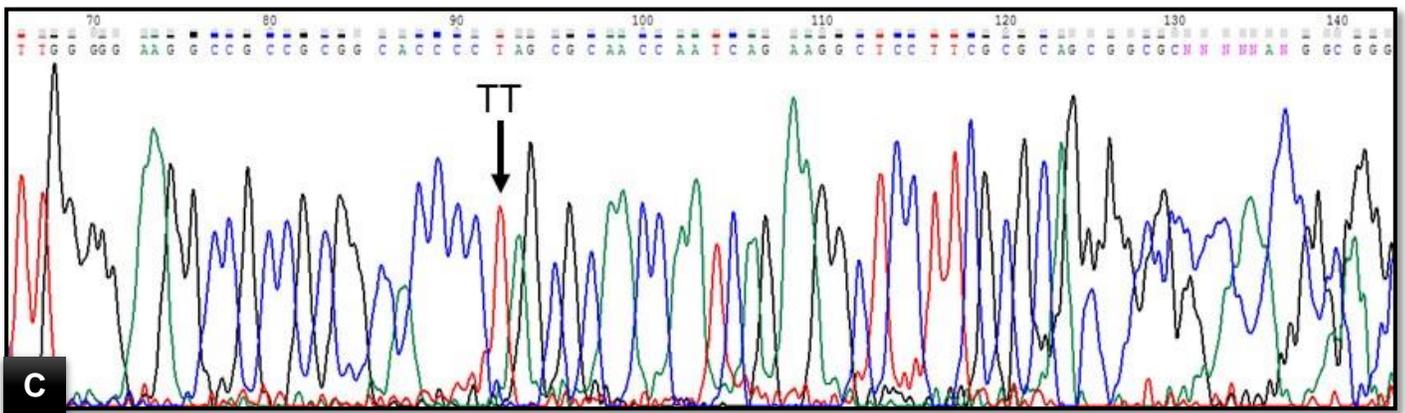
Se obtuvieron los electroferogramas de las secuencias del fragmento de interés del gen *AKR1B1* (Figura 8).



Fotografía tomada del secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)



Fotografía tomada del secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)



Fotografía tomada del secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Figura 8. Secuenciación nucleotídica que muestra las diferentes variantes (CC, CT y TT Figura A, B y C respectivamente) de la región UTR5' del gen aldosa reductasa (*AKR1B1*). Cada pico representa una base nitrogenada, al presentar dos picos en una misma posición significa que el sujeto es heterocigoto para ese alelo. El código de colores es el siguiente: T = rojo, C = azul, A = Verde y G = negro

Se calculó la frecuencia genotípica y los valores fueron comparados entre los grupos de casos y controles (Tabla 2, Figura 9). De igual forma, se calculó la frecuencia alélica y los valores fueron comparados entre ambos grupos. (Tabla 3, Figura 10)

Tabla 2—Frecuencias genotípicas de casos y controles en variante rs759853 (g.-106C>T) de AKR1B1

AKR1B1 rs759853 (g.-106C>T)	Controles Frecuencia Genotípica (n)	Casos Frecuencia Genotípica (n)	P	OR (95%IC)
GENOTIPO				
TT	0.34 (11)	0.15 (4)		
CT	0.59 (19)	0.42 (11)	0.3736	0.63
CC	0.06 (2)	0.42 (11)	0.003	15.13

*Comparando con controles. Un valor $p \leq 0,05$ fue considerado significativo

Tabla 3—Frecuencias alélicas de casos y controles en variante rs759853 (g.-106C>T) de AKR1B1

AKR1B1 rs759853 (g.-106C>T) ALELOS	Controles Frecuencia Alélica	Casos Frecuencia Alélica	p	OR
T	0.64	0.37		
C	0.36	0.63	0.0028	3.1

*Comparando con controles. Un valor $p \leq 0,05$ fue considerado significativo

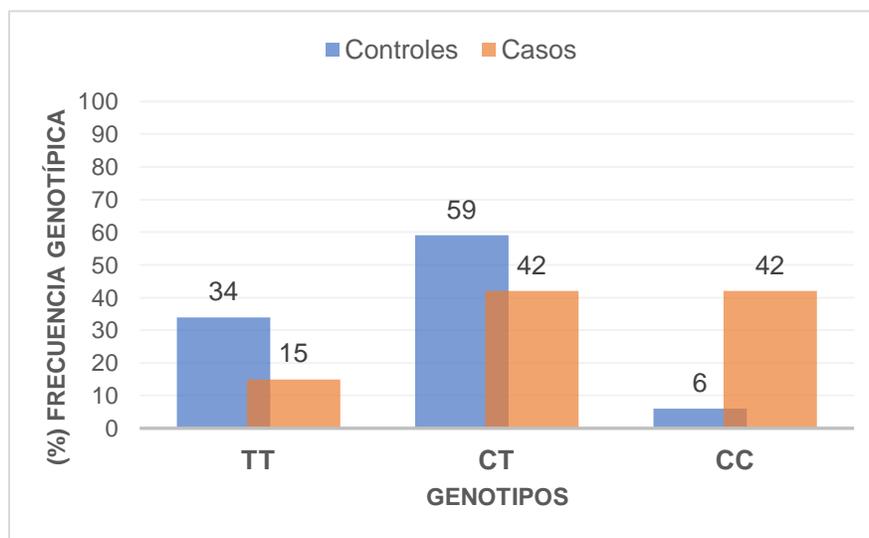


Figura 9. **Frecuencias genotípicas de la variante en estudio presentadas en porcentaje.** Se obtuvo una relación estadística entre el gen silvestre de la variante y los genotipos observados. Para la frecuencia genotípica de la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen *AKR1B1*, se observa una diferencia significativa entre la relación estadística de los genotipos TT/CC obteniendo un valor de $p=0.003$. Por otra parte, para los genotipos TT/CT no se observa una diferencia entre la relación estadística obteniendo un valor de $p=0.3736$, considerando un nivel de significancia menor o igual a 0.05.

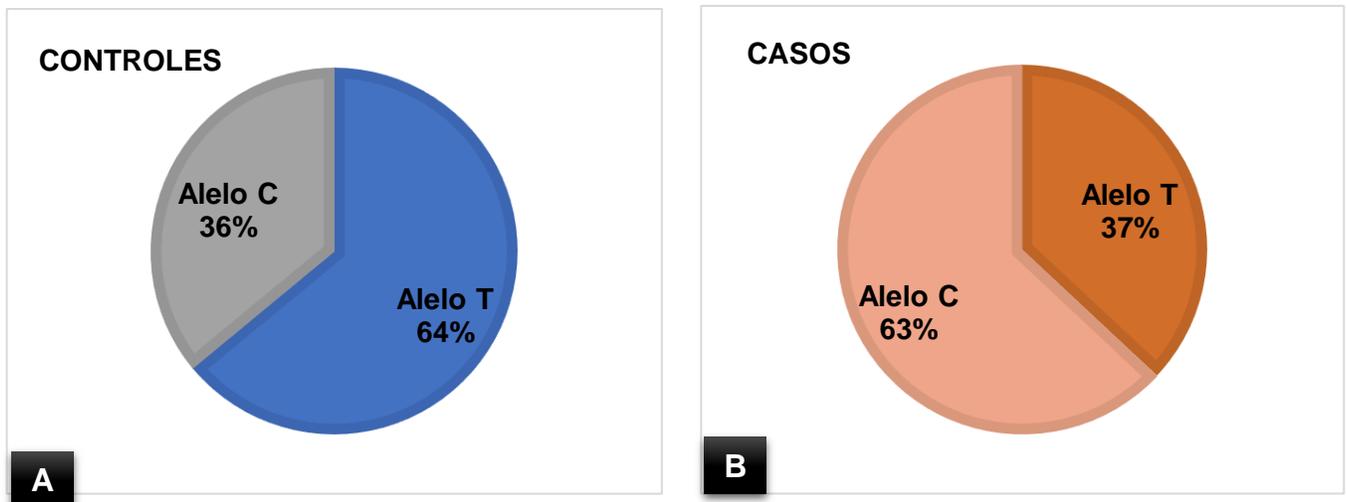


Figura 10. Frecuencias alélicas de la variante en estudio representadas en porcentaje. (Figuras A y B) Para la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen *AKR1B1* se observa una diferencia significativa entre la relación del alelo T con el alelo C obteniendo una $p=0.0028$, considerando un nivel de significancia menor o igual a 0.05.

Se calculó la cantidad de pacientes esperados (n esperada) y la frecuencia genotípica esperada de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg tanto de la población presente en los casos estudiados como en la población presente en los controles estudiados. Posteriormente se realizó la prueba estadística de X^2 , con el objetivo de determinar discrepancias entre la distribución observada y la esperada.

Tabla 4—Datos utilizados para determinar si población de CONTROLES en estudio se encuentran en equilibrio de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg.

Genotipo	n observada	Frecuencia Genotípica observada	Frecuencia alélica	n esperada	Frecuencia Genotípica esperada
TT	11	0.34	0.64	13	0.41
CT	19	0.59	---	15	0.46
CC	2	0.06	0.36	4	0.13
TOTAL	32	1.00	1	32	1.00

n= número de pacientes estudiados

Tabla 5—Datos utilizados para realizar la prueba de X^2 para los CONTROLES estudiados.

$X^2_{calculada}$	2.62
X^2_{tablas}	3.84*
CONCLUSIÓN	No se rechaza H_0 Por lo tanto, la población SI está en equilibrio.

*Considerando un $\alpha=0.05$

En donde $H_0 =$ “La población sí está en equilibrio”

Sí $X^2_{calculada} > X^2_{tablas}$: Rechazo H_0 , por otra parte; Sí $X^2_{calculada} < X^2_{tablas}$: No rechazo H_0

Tabla 6—Datos utilizados para determinar si población de CASOS en estudio se encuentran en equilibrio de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg.

Genotipo	n observada	Frecuencia Genotípica observada	Frecuencia alélica	n esperada	Frecuencia Genotípica esperada
TT	4	0.16	0.37	4	0.14
CT	11	0.42	---	12	0.47
CC	11	0.42	0.63	10	0.39
TOTAL	26	1.00	1	26	1.00

n= número de pacientes estudiados

Tabla 7—Datos utilizados para realizar la prueba de X^2 para los CASOS estudiados.

$X^2_{calculada}$	0.201
X^2_{tablas}	3.84*
CONCLUSIÓN	No se rechaza H_0 Por lo tanto, la población SI está en equilibrio

*Considerando un $\alpha=0.05$

En donde $H_0 =$ “La población sí está en equilibrio”

Sí $X^2_{calculada} > X^2_{tablas}$: Rechazo H_0 , por otra parte; Sí $X^2_{calculada} < X^2_{tablas}$: No rechazo H_0

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La retinopatía diabética es una entidad clínica considerada una de las complicaciones más comunes de la diabetes mellitus, existen múltiples estudios clínicos que han intentado elucidar los factores de riesgo para el inicio y desarrollo de la retinopatía diabética.

Los estudios genéticos muestran que algunos genes están relacionados con el desarrollo de la RD, en 2017 *Dong*, describió que la variante del gen *CEP135* rs4865047 tenía relación con el riesgo de desarrollar RD en pacientes con diabetes tipo 1, pero no la variante del gen *NPY2R* rs1902491.

Por otro lado, *Kaur* en 2016, describió que el gen que codifica para la aldosa reductasa podría ser un candidato de estudio para buscar la asociación de la variante rs759853 (g.-106C>T) con la presencia de RD en pacientes con diabetes tipo 2. Se investigó, la asociación de la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen de la aldosa reductasa *AKR1B1* con el desarrollo de la RD en pacientes del norte de la India que presentaban DM tipo 2, en dónde se reportó en los resultados generados haber obtenido una *diferencia estadísticamente significativa* en la frecuencia genotípica de la variante de *AKR1B1* rs759853 (g.-106C>T) entre los casos y controles evaluados.

En el presente estudio, se ha evaluado la asociación de la variante en el gen *AKR1B1* rs759853 (g.-106C>T) con el desarrollo de la retinopatía diabética en pacientes mexicanos diagnosticados con RD(n=26) representando a los casos,

comparados con pacientes diagnosticados con DM tipo 2 que no presentaban RD (n=32), tomados como controles.

En la comparación entre algunas de las características clínicas tanto de los 32 pacientes con DM tipo 2 tomados como grupo control, como de los 26 pacientes diagnosticados RD, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en cuanto a sexo, edad y años que lleva presentando DM tipo 2. Observando, por una parte, que los resultados de las características de edad y sexo, concuerdan con los resultados obtenidos y registrados por *Kaur* en 2016, en cuanto a que no existe diferencia estadísticamente significativa de estas dos características entre casos y controles, sin embargo, *Kaur* reporta de igual forma en 2016 que existe diferencia estadísticamente significativa entre la duración de la enfermedad (DM tipo 2) entre casos y controles, observando para este estudio, que dicha característica no presenta diferencia. Por lo que se sugiere, se parte de poblaciones tanto de casos como de controles con características de sexo, edad y años presentando DM tipo 2 similares.

En cuanto a las frecuencias genóticas, de casos y controles, de la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen *AKR1B1* se observa que para el grupo control, el 59% presentó el genotipo CT mientras que, sólo el 42% de la población con RD presentó dicho genotipo.

Por otra parte, se observa que 42% de los pacientes con RD presentaron el genotipo CC, en comparación con los individuos pertenecientes al grupo control de los cuales únicamente el 6% presentó este genotipo. En un meta- análisis realizado por *Abhary, S, et al., 2009*. Se encontraron diversas variantes en el gen que codifica

para la aldosa reductasa *AKR1B1*, asociados significativamente con el desarrollo de la retinopatía diabética mediante pruebas estadísticas, partiendo de ese punto se observa que, una vez realizada la prueba estadística correspondiente, los resultados sugieren que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el genotipo CC con respecto al genotipo TT de las dos poblaciones en estudio, por lo que después de calcular el OR, éste indica que existen 15 veces mayor riesgo de desarrollar RD si se tiene el genotipo CC en comparación con que se tenga el genotipo TT sugiriendo entonces que el genotipo CC representa el genotipo de riesgo al desarrollo de la enfermedad, siendo presentado en mayor medida por los pacientes con RD, lo cual puede observarse en la figura 9.

De igual forma se sugiere que el alelo T podría desempeñar un papel como alelo protector, esto debido a que en la figura 10 es posible observar que, los controles presentan una mayor proporción del alelo T y en menor proporción el alelo C, en cambio, los casos presentan en mayor proporción el alelo C en el genotipo y en menor proporción el alelo T, lo cual sugiere que C podría tratarse del alelo de riesgo a la enfermedad.

Después de calcular el OR, éste indica que existen 3 veces mayor riesgo de desarrollar RD si se es portador del alelo C en comparación con el alelo T. Dichos hallazgos concuerdan con lo obtenido por *Katakami et al.* en 2011, *Santos et al.* en 2006, *Li et al.* en 2002 y *Olmos et al.* en 2006, reportando la asociación del genotipo CC de la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen *AKR1B1* con el desarrollo y progresión de la retinopatía diabética en población japonesa, caucásica-brasileña, china y chilena, respectivamente con DM tipo 2.

Sin embargo, los resultados anteriormente descritos contradicen lo reportado por *Kaur et al.* en 2016, en donde menciona en el estudio de asociación de casos-controles realizado en población de la India, haber asociado al genotipo TT del gen *AKR1B1* (g.-106C>T) como factor de riesgo para desarrollar RD. Así mismo, los resultados obtenidos en este estudio, contradicen a *Wang et al.*, en donde reporta en 2003, en un estudio de 738 pacientes chinos con DM tipo 2 haber obtenido resultados que sugieren al alelo T como factor de riesgo para presentar RD.

Por lo que, la posible explicación de la discrepancia de resultados que existe entre las diferentes poblaciones podría ser atribuida a los tamaños variables de muestra, diferencias étnicas, así como tomar en cuenta que existen diversos antecedentes genéticos y ambientales entre poblaciones.

Por otra parte, es posible explicar la asociación de la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen *AKR1B1*, el cual codifica para aldosa reductasa, con el desarrollo de la retinopatía diabética mediante la afinidad que presentan los factores de transcripción. De tal forma que con los resultados obtenidos en este estudio se sugiere que al existir la variante g.-106C>T podría existir mayor afinidad de los factores de transcripción del gen *AKR1B1* por lo que al existir mayor afinidad se codifica en mayor cantidad la enzima aldosa reductasa, la cual contribuye a un incremento en el estrés oxidativo mediante dos formas:

La primera de ellas es mediante un decremento de los niveles de NADPH. El decremento de este cofactor resulta en la reducción de los niveles de glutatión, un importante antioxidante intracelular, produciendo entonces un desequilibrio entre las

especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes intracelulares, es decir, estrés oxidativo.

La segunda de ellas es debido a que la aldosa reductasa, al ser enzima limitante de la ruta del poliol, contribuye a una mayor conversión de glucosa a sorbitol, siendo este último el que contribuye a un aumento del estrés oxidativo produciendo daño o pérdida de los pericitos de la retina, células en donde principalmente se expresa el gen *AKR1B1* responsables de tener una función similar al músculo liso regulando el tono vascular y la presión de perfusión. Por lo que dicho daño resulta en un incremento en la permeabilidad de la membrana, contribuyendo a la deposición de fluidos, así como hemorragias en la retina imposibilitando la capacidad de convertir las imágenes captadas en señales eléctricas y enviarlas por el nervio óptico al cerebro, provocando entonces la pérdida de la visión.

Finalmente, se determinó con base en la Ley de Hardy-Weinberg, si las poblaciones de estudio para casos y controles se encontraban en equilibrio, teniendo como resultado que las poblaciones, tanto casos como controles, se encuentran en equilibrio, comportamiento que se observa como normal debido a que se considera que una población que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg es una población ideal, de tal forma que siguiendo los postulados que establece dicha ley, una población en equilibrio conserva sus frecuencias alélicas para la siguiente generación, es decir, no tiene capacidad de evolucionar.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, la variante rs759853 (g.-106C>T) del gen *AKR1B1* mostró asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de la retinopatía diabética en el grupo de casos analizados de pacientes mexicanos con diabetes que presentaban retinopatía diabética, comparándolos con pacientes mexicanos con DM tipo 2 sin retinopatía diabética utilizados como grupo control. En donde, la razón de momios (OR) nos indica que existe la posibilidad 15 veces mayor de desarrollar RD si se tiene el genotipo CC, el cual representa el genotipo de riesgo, así mismo, se sugiere, que C podría tratarse del alelo de riesgo a la enfermedad de acuerdo al OR que indica que existe la posibilidad 3 veces mayor de desarrollar RD. Siendo entonces el alelo T, el alelo que protege contra el riesgo de desarrollar RD.

Con base en la literatura previa consultada, este es el primer estudio que reporta una asociación de la variante rs759853 (g.-106C>T) en el gen *AKR1B1* con el desarrollo de RD en pacientes con DM tipo 2 en México. La identificación de marcadores genéticos asociados a la predisposición de enfermedades, pueden llegar a ser de utilidad, en un futuro, para la medicina personalizada.

Finalmente, para confirmar la relación que existe entre la variante rs759853 (g.-106C>T) en el *AKR1B1* con el desarrollo y progresión de la RD y otras complicaciones microvasculares, es necesario realizar estudios similares de asociación en diferentes grupos étnicos y con un tamaño de muestra mayor, con el fin de minimizar factores que pueden contribuir en el resultado final de asociación.

GLOSARIO

Alelo: Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen, un individuo hereda dos alelos para cada gen, uno del padre y otro de la madre. Los alelos se encuentran en la misma posición dentro de los cromosomas homólogos.

Anemia: Disminución de masa eritrocitaria y de la concentración de la concentración de hemoglobina circulantes por el organismo.

Arteriolas: Vaso sanguíneo de pequeña dimensión, que resulta de ramificaciones de las arterias y libera la sangre hacia los capilares.

Aterosclerosis: Enfermedad vascular de evolución crónica, dinámica y evolutiva que aparece por el concurso de tres factores principales: disfunción endotelial, inflamación y trombosis.

Enfermedad periférica vascular: Consiste en un daño u obstrucción en los vasos sanguíneos más alejados del corazón, las arterias y venas periféricas.

Epigenética: Se refiere a los cambios heredables en el ADN e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina, por lo que afectan la expresión génica y el fenotipo.

Estrés oxidativo: Se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) y antioxidantes, lo cual potencialmente conduce a daño en tejidos.

Etiopatogenia: Es un término médico que se refiere al origen de una enfermedad y sus mecanismos, es decir, la combinación de etiología y patogénesis.

Exudados duros: Depósitos extracelulares de lípidos y lipoproteínas. Se ven aislados o agrupados, en forma de estrella, anillo (parcial o completo) o placas compactas

Frecuencia Alélica: Medida de la presencia de un alelo dado en una población, es la proporción de todos los alelos de ese gen en la población que corresponden específicamente a ese tipo.

Frecuencia Genotípica: Es la frecuencia o proporción de un genotipo dado en una población.

Gen: Unidad básica, tanto física como funcional, de la herencia, y transmite información de una generación a la siguiente, los genes están dispuestos, unos tras otros, en estructuras llamadas cromosomas.

Genotipo: Descripción del conjunto de genes que hereda un individuo de sus progenitores, el genotipo de un individuo permanece invariable a lo largo de su vida, con independencia del entorno que lo rodea y afecta.

Gen silvestre: Asociado al fenotipo normal, el más común en la población. Opuesto a alelo mutante.

Heredabilidad: Es la proporción de la variación de caracteres biológicos en una población atribuible a la variación genotípica entre individuos. La variación entre individuos se puede deber a factores genéticos y/o ambientales.

Heterocigoto: Con respecto a un gen específico, el organismo posee dos alelos diferentes de ese gen para un rasgo dado en los dos cromosomas homólogos (por ejemplo, un genotipo es Aa).

Homocigoto: Con respecto a un gen específico, el organismo posee dos copias idénticas de ese alelo. (por ejemplo, un genotipo es aa o AA).

Microaneurismas: Primeros signos oftalmoscópicos de la RD se localizan en la capa nuclear interna de la retina, se observan como pequeños puntos rojos, redondeados, con bordes lisos bien definidos. Miden entre 15 y 125 micras. Localizados con mayor frecuencia en el lado temporal de la mácula. Se forman de capilares venosos y con mayor frecuencia de los arteriales.

Nefropatía: Complicación crónica de la DM, se trata acerca de alteraciones en el riñón que se producen en personas con diabetes cuando su control de la glucosa en sangre no ha sido adecuado, aunque también se asocia a otros factores, entre ellos genéticos.

Neuropatía: Complicación microvascular, alteración causada por la diabetes que afecta a los nervios que se encuentran distribuidos por el cuerpo y que conectan la médula espinal con los músculos, piel, vasos sanguíneos y el resto de los órganos, por lo que puede afectar a cualquier parte del cuerpo humano.

Pericitos: También conocidos como células murales, dan soporte el cual estabiliza los capilares maduros, a los que se les ha atribuido un papel estructural. Normalmente existe un pericito por cada célula endotelial.

Prevalencia: Es la proporción de individuos de una población que presentan el evento en un momento, o periodo de tiempo, determinado.

Población en genética: Grupo de individuos que comparten un acervo genético común y tienen la posibilidad de aparearse.

Polidipsia: Necesidad exagerada y urgente de beber, que suele ser patológica y acompaña a enfermedades como la diabetes.

Polifagia: Sensación imperiosa e incontenible de hambre que se presenta en determinadas enfermedades.

Variante: Coexistencia de dos o más fenotipos alternos en una misma población o entre poblaciones. Por lo general, los diversos fenotipos son originados por los alelos alternos de un gen.

Variante de un solo nucleótido (SNP): Variación de una base por otra en un lugar específico del genoma, se encuentra en más de un 1 % de la población. Son la forma más común de variación genética.

Poliuria: Excreción abundante de orina.

Razón de Momios: Medida estadística utilizada en estudios epidemiológicos transversales de casos y controles, es la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro, suele realizarse entre grupos que presentan condiciones de vida similares, con la diferencia de que uno se encuentra expuesto a un factor de riesgo, mientras que el otro carece de esta característica. Por lo tanto, la razón de momios o de posibilidades es una medida de tamaño de efecto.

Riesgo Relativo: Cociente entre el riesgo en el grupo con el factor de exposición o factor de riesgo y el riesgo en el grupo de referencia (que no tiene el factor de exposición) como índice de asociación.

REFERENCIAS

- Abhary, S. (2009). *A Systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy*. Australia : American Diabetes Association.
- Altomare, F. (2018). Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee. *Elsevier*, 210-216.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of. *Diabetes Care* , 81-90.
- Carriero, V. (2016). Risk factors for diabetic retinopathy: a case-control study. *International Journal of retina and vitreous*, 2-21.
- Chawla, A. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* , 546-551.
- Crawford, K. (2017). Review of 2017 Diabetes. *Elsevier Inc.*, 621-633.
- Federación Mexicana de Diabetes . (2018, Julio 28). *Federación Mexicana de Diabetes*. Retrieved from Diabetes en México : <http://fmdiabetes.org/diabetes-en-mexico/>
- Hancock, J. R. (2001). Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signaling Pathways. . *Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification*, 345-350.
- International Diabetes Federation. (2017). IDF Diabetes Atlas . *IDF Diabetes Atlas Eight Edition*, 40-95.
- Kaur, N. (2016). Association od aldose reductase gene (AKR1B1) polymorphism with diabetic retinopathy. . *Diabetes Research and Clinical Practice* , 41-18.
- Kharroubi, A., & Darwish, H. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 850-867.
- National Center of Biotechnology Information . (2019, Septiembre 11). *NCBI Gene*. Retrieved from AKR1B1 aldo-keto reductase family 1 member B [

Homo sapiens (human)]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/231#general-gene-info>

NOM-015-SSA2-2010. (2018, Julio 20). *NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus*. Retrieved from NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.:http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010

Pasquel, F. (2014). Hyperosmolar Hyperglycemic state: a historic review of the clinical presentation, diagnosis and treatment . *Diabetes Care* , 3120-3130.

Pereira, C. (2015). Diabetes Mellitus: The Linkage Between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 27.

Rosell, A. (2006). Anemias. *Servicio de Hematología H. U. Dr Peset.* , 1-28.

Tenorio, G. (2010). Retinopatía diabética; conceptos actuales . *Revista medica del hospital general de méxico*, 193-201.

Tran, T. (2017). Review of evidence for Adult diabetic ketoacidosis management protocols. *Front Endocrinol*, 106-119.

Umpierrez, G. (2016). Diabetic emergencies-ketoacidosis,hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. *Nature Reviews/Endocrinology*, 222-232.

Uniprot. (2019, Septiembre 18). *Uniprot*. Retrieved from UniProtKB - P15121 (ALDR_HUMAN): <https://www.uniprot.org/uniprot/P15121>

Wong, T. (2016). Diabetic retinopathy. *Nature reviews/Disease Primers*, 1-17.

Zaman, S. (2014). Molecular Mechanisms of Diabetic Retinopathy, General Preventive Strategies, and Novel Therapeutic Targets. *BioMed Research International*, 1-18.

ANEXO A. Consentimiento informado



CDMX, a _____ de _____ de _____.

Consentimiento informado:

En el Hospital Fundación Nuestra Señora de la Luz se lleva a cabo un estudio titulado “**Polimorfismo -106C>T del gen AKR1B1 en pacientes con retinopatía diabética**” el cual se realiza en el Centro de Investigación Biomédica, este estudio está bajo responsabilidad del Dr. Héctor Javier Pérez Cano.

Se me ha informado que se requiere una muestra de sangre que se obtendrá en un tubo con una aguja por punción de la vena del brazo, esto no representa ningún riesgo para mi salud, pero existe la posibilidad de formación de un moretón. Se me ha explicado que mi muestra se utilizará para fines de investigación y que, en caso de ser paciente de la institución, la toma de muestra **NO** modifica mi diagnóstico, mi tratamiento ni la atención recibida por parte del personal del hospital. También me han señalado que puedo retirar mi consentimiento para participar en la investigación en el momento que yo lo desee.

Es por eso que:

Yo _____ con fecha de nacimiento _____
acepto participar en este estudio y autorizo que se obtenga una muestra de mi sangre.

Firma: _____ Teléfono _____

Responsable de toma de muestra: _____

Testigo: _____

Testigo: _____