



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

“PERFIL PROINFLAMATORIO DE CITOCINAS PRESENTE EN EL SUERO DE PACIENTES MEXICANOS CON DIFERENTES ESTADIOS DE RETINOPATÍA DIABÉTICA SECUNDARIA A DIABETES MELLITUS TIPO DOS.”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
“DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS”

PRESENTA:

M. EN C. JONATHAN URIEL QUEVEDO MARTÍNEZ

TUTOR:

DR. VÍCTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCÍO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CDMX A 1RO DE MAYO DE 2021



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.

ÍNDICE:

Resumen estructurado:	3
Marco teórico:	4
Antecedentes	30
Planteamiento del problema	38
Pregunta de investigación	38
Justificación	38
Hipótesis	39
Objetivo principal	39
Objetivos específicos	39
Metodología	41
Resultados	46
Discusión	48
Conclusiones	52
Tablas y Figuras	53
Anexos	59
Bibliografía	64

RESUMEN ESTRUCTURADO.

Objetivo: Esta descrito que las citocinas proinflamatorias están elevadas en pacientes con retinopatía diabética (RD), esto puede contribuir a la fisiopatología de la enfermedad. El objetivo de este estudio es medir la concentración de diversas citocinas inflamatorias de las principales respuestas inflamatorias CD4 + T helper en suero sanguíneo de pacientes mexicanos con RD en diferentes estadios utilizando la tecnología CBA, y correlacionarlas con la presencia y severidad de la RD con el fin de encontrar posibles biomarcadores de RD que sirvan como predictores diagnósticos o terapéuticos.

Métodos: se incluyeron 64 sujetos en el estudio, 16 en el grupo control, 16 en el grupo DM2 sin RD (NDR), 16 en el grupo RD no proliferativo (NPDR) y 16 en el grupo RD proliferativo (PDR). Las concentraciones de citoquinas de IL - 1 β , IL - 2, IL - 4, IL - 6, IL - 8, IL - 10, IL - 12, IL - 17^a, TNF - α e IFN - γ y en muestras de suero se midieron utilizando el kit CBA para TH1 / TH2 / TH17 en humanos.

Resultados: IL-6, IL-12, IL-17^a y TNF α fueron significativamente mayores en los pacientes con RD en comparación con el grupo de control. El grupo de PDR mostró una concentración ligeramente más baja de citocinas en suero IL-6, IL-12 e IL-17^a. El TNF α mostró una concentración más alta en comparación con los controles sanos, sujetos NDR y NPDR. También se encontró una correlación estadística positiva entre la presencia y la gravedad de la RD con los parámetros clínicos HbA1c, IMC, creatinina sérica y concentración de citocinas séricas IL-6 y TNF α .

Conclusión: Nuestros hallazgos sugieren que los pacientes con diabetes y RD en sus diferentes grados tienen un perfil inflamatorio crónico más fuerte en comparación con los sujetos no diabéticos.

INTRODUCCIÓN

MARCO TEÓRICO

Definición e impacto de la enfermedad.

La diabetes mellitus es una patología crónica altamente prevalente que se caracteriza por la ausencia absoluta o relativa de insulina, así como hiperglucemia, dislipidemia y daño neurovascular. La diabetes mellitus tipo dos consiste en una disfunción caracterizada por hiperglucemia que es resultado de una combinación entre una secreción excesiva de glucagón, inadecuada secreción de insulina y una resistencia a la acción de la insulina; como consecuencia de lo anterior se observan un conjunto de complicaciones microvasculares, macrovasculares y neuropáticas. Las complicaciones microvasculares de la diabetes incluyen afección renal y ocular, más específicamente en la retina. Las enfermedades vasculares periféricas y de las arterias coronarias son resultados del daño macrovascular. El daño físico genera una incapacidad laboral psicosocial con repercusiones a la calidad de vida y la economía local y global. ¹

La diabetes es una de las enfermedades asociadas al envejecimiento y cuyo riesgo incrementa al avanzar la edad. ² La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tiene un impacto global ya que la enfermedad contribuyó a 1.5 millones de muertes en 2012 con una prevalencia de 8.5% de la población en 2014 (Organización Mundial de la Salud 2016). Una de los principales problemas con los pacientes con DM2 son los daños colaterales asociadas a la alteración en la función renal, cardiovascular y visual entre otras. ³

De acuerdo a la última ENCUESTA NACIONAL DE SALUD, la prevalencia en México al 2016 es de 9.4% de la población, con mayor prevalencia en individuos de entre 60 a 69 años de edad. En el último reporte de la ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN DE DESARROLLO ECONÓMICO (OCDE) de 2018 reporta que la prevalencia de diabéticos en México es del 15% de la población.

Aunque la DM2 tiene una edad de presentación afectando individuos mayores de 40 años, se ha diagnosticado en niños desde dos años de edad.

Fisiopatología:

La DM2 se caracteriza por la combinación de resistencia periférica a la insulina y una secreción inadecuada la insulina por las células beta del páncreas. La resistencia a la insulina se ha atribuido a elevación de los ácidos grasos y las citosinas proinflamatorias en el plasma, lo que lleva a una disminución del transporte de glucosa a las células musculares y una elevada producción de glucagón. Se le considera una paracrinopatía en la que se pierde la relación entre la secreción de glucagón por las células alfa y se pierde la secreción de insulina por las células beta, lo anterior lleva a una hiperglucagonemia y por lo tanto hiperglucemia. ⁴

Para los pacientes con DM2 un principio fundamental de la fisiopatología es que exista resistencia a la insulina asociada a una inadecuada secreción de insulina. Los pacientes que desarrollan diabetes son aquellos que no pueden aumentar la secreción de insulina lo suficiente para compensar la resistencia a la insulina. Las concentraciones de insulina pueden estar a un nivel elevado sin embargo siguen siendo inapropiadas para controlar el nivel de glucemia. ⁵

La **disfunción de las células beta pancreáticas** es un factor importante presente en los pacientes con prediabetes. Esta disfunción esta presente en las etapas tempranas del proceso patogénico y no antecede a la resistencia a la insulina. ⁶

En la progresión entre una tolerancia a la insulina fisiológica y anormal, los niveles de glucosa posprandial son los primeros en afectarse. Eventualmente se presenta la hiperglucemia en ayuno conforme se suprime la gluconeogénesis hepática.

Durante el proceso de gestación de **resistencia a la insulina** (como el que ocurre en un sujeto fisiológico posterior a una ingesta de dieta altamente calórica, esteróide sistémico o inactividad física) aumentan los niveles de glucagón e incrementa la glucosa dependiente del polipéptido insulínico lo que lleva a una intolerancia a la glucosa. Lo anterior no está relacionado con modificaciones en los niveles del péptido similar al glucagón posprandial. ⁷

Los estudios de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) han identificado variantes genéticas que se han asociado con la disfunción de células beta y resistencia a la insulina. Algunos de estos SNPs aumentan el riesgo de presentar DM2. Se ha demostrado asociación a más de 40 loci independientes de entre los cuales los que tienen una asociación más fuerte son:

- Disminución de la sensibilidad de las células beta, lo cual correlaciona con una alteración del procesamiento de la insulina y una disminución de la secreción de insulina. (TCF7L2)
- Diminución temprana de la liberación de insulina estimulada por glucosa (MTNR1B, FADS1, DGKB, GCK)
- Alteración del metabolismo de los ácidos grasos insaturados (FADS1)
- Disregulación del metabolismo de las grasas (PPARG)
- Inhibición de la liberación de glucosa sérica (KCNJ11)
- Incremento de la resistencia a la insulina y producción de adipositos (FTO y IGF2BP2)
- Control del desarrollo de estructuras pancreáticas incluyendo a los islotes de células beta (HHEX)
- Transportador de zinc de las células beta que influye en la producción y secreción de insulina (SLC30A8)
- Supervivencia y función de las células beta (WFS1)

La susceptibilidad al DM2 puede estar afectada por variantes genéticas que incluyen a la incretina, que se libera de las células endocrinas en el intestino y la secreción de insulina en respuesta a la digestión de alimentos (HMGA1)^{8, 9, 10}

El metabolismo de los aminoácidos tiene un papel fundamental en el desarrollo de DM2. Se ha reportado un riesgo 4 veces más grande de desarrollar DM2 en individuos normoglicémicos con altas concentraciones de 3 aminoácidos en plasma (isoleucina, fenilalanina y tirosina). Concentraciones de estos aminoácidos se elevaron hasta 12 años previos al desarrollo de DM2.¹¹

Fisiopatología de las complicaciones de la DM2

A pesar de que la fisiopatología entre dos tipos diferentes de diabetes, la gran mayoría de las complicaciones, incluyendo la microvascular, macrovascular y neuropática son similares para el tipo uno y dos. La hiperglicemia parece ser el factor determinante de las complicaciones metabólicas. De entre las complicaciones las macrovasculares son las que tienen una relación más débil con la glucemia sérica.

El desgaste de los telómeros está directamente asociado a la presencia y extensión de las complicaciones diabéticas.¹²

Riesgo cardiovascular:

El riesgo cardiovascular en personas con diabetes se relaciona en parte con la resistencia a la insulina y con alguna o varias de las siguientes alteraciones:

- Aumento de los niveles de lipoproteína de baja densidad
- Disminución de los niveles de lipoproteína de alta densidad
- Niveles elevados de triglicéridos.

Las alteraciones relacionadas con trombosis (aumento del inhibidor del activador del plasminógeno, y fibrinógeno elevado y aumento de los niveles de fibrinógeno) e hipertensión arterial sistémica también están relacionados.

La resistencia a la insulina está asociada con el incremento de la acumulación de lípidos en el hígado y músculo liso pero no en el miocardio.

El incremento en el riesgo cardiovascular inicia previo al desarrollo a hiperglicemia franca y hay varios reportes que lo asocian a la resistencia a la insulina.¹³

Deterioro cognitivo.

La DM2 está asociada con atrofia del hipocampo, lóbulo temporal, lóbulo frontal y sustancia gris límbica, en menor medida se puede encontrar atrofia de la sustancia blanca en los lóbulos temporal y frontal. La distribución de los cambios anatómicos es bilateral pero de predominio en el lóbulo izquierdo, similar a los cambios descritos en la enfermedad de Alzheimer. Los cambios estructurales anteriormente

mencionados están asociados con un pobre desempeño en ciertas pruebas cognitivas, disminuyendo la capacidad hasta en un 50%.¹⁴

Etiología:

La etiología de la DM2 involucra la interacción de varios factores ambientales y genéticos. Es decir un estilo de vida con ingesta de dieta hipercalórica, obesidad, sedentarismo cuando se mezcla con un genotipo compatible con desarrollo de diabetes. El índice de masa corporal (IMC) en el que el aumento de peso incrementa el riesgo de diabetes varía en cada grupo étnico (los asiáticos y caucásicos). La hipertensión y la prehipertensión están asociados al desarrollo de diabetes mellitus en caucásicos más que en afroamericanos.¹⁵

El 90% de los pacientes que desarrollan DM2 tienen obesidad, sin embargo un estudio concluye que una dieta muy energética independiente de la obesidad de base.¹⁶

Algunos estudios sugieren que contaminantes ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de DM2.

Factores de riesgo mayores:

- Edad mayor de 45 años
- Sobrepeso mayor del 20% del peso ideal
- Historia familiar de DM2 en familiares de primer grado
- Raza hispana, afroamericana, Asiático, Caucásico
- Alteración a la tolerancia a glucosa o cifras elevadas en ayuno
- Hipertensión arterial sistémica (>140/90mmHg)
- Dislipidemia (HDL <40mg/dL o triglicéridos >150mg/dL)
- Historia de diabetes gestacional
- Síndrome de ovario poliquístico (por resistencia a la insulina)

Epidemiología:

La DM2 es más común en los países occidentales por el tipo de dieta hipercalórica y la tendencia al sedentarismo. Los índices de diabetes se incrementan a nivel mundial. La federación internacional de diabetes predice que el número de habitantes con diabetes llegara a 552 millones para 2030.

Los 10 países con mayor concentración de pacientes diabéticos actualmente son India, China, Estados Unidos, Indonesia, Japón, Pakistán, Rusia, Brasil, Italia y Bangladesh. El mayor porcentaje de incremento en diabéticos en los próximos 20 años ocurrirá en África donde actualmente esta infradiagnosticado por lo que se eleva la muerte por complicaciones de esta enfermedad.

Pronóstico:

El pronóstico en pacientes con diabetes mellitus esta influenciada por el grado de control de la enfermedad. La hiperglucemia crónica esta asociada a un incremento en las complicaciones microvasculares como lo indica el Estudio de control y complicaciones de diabetes. Si el nivel de glucosa regresa a rangos normales es un buen indicador para disminuir la progresión de la enfermedad asociándola a un mejor pronóstico. ¹⁷

Morbilidad y mortalidad asociada a diabetes mellitus.

Las complicaciones diabéticas particularmente la enfermedad cardiovascular (50-75% de los casos médicos) son las mayores fuentes de gasto económico de los pacientes con diabetes mellitus.

Insuficiencia renal:

La diabetes mellitus y particularmente la DM2 es la causa más frecuente de insuficiencia renal en etapas tardías. En el centro de control de enfermedades (CDC) de Estados Unidos reporta que en 2018 se presentaron 44% de casos nuevos con insuficiencia renal asociado a DM2, de estos 48274 pacientes presentaba enfermedad que ameritaba terapia de reemplazo y para entonces 202290 pacientes con diabetes se encontraba en diálisis o había recibido trasplante renal.

Neuropatía y vasculopatía:

La DM2 es la causa más frecuente de amputaciones no traumáticas de miembros inferiores. Secundarias a neuropatía diabética y a alteraciones en la microvasculatura de miembros pélvicos inferiores.

Enfermedad cardiovascular:

El riesgo de enfermedad coronaria es de 2 a 4 veces más grande en pacientes con diabetes comparado con pacientes sin diabetes. La enfermedad cardiovascular es la causa de mortalidad más importante en pacientes con DM2. De estos las mujeres tienen una incidencia más importante. En pacientes con DM2, una glucosa en ayuno mayor a 100mg/dL contribuye significativamente a enfermedad y muerte cardiovascular independientemente de los demás factores de riesgo. El estudio concluye que un pobre control de los niveles glicémicos incrementan de forma significativa la enfermedad cardiaca. ¹⁸

Cáncer:

Los pacientes con DM2 tienen aumento en el riesgo de presentar diferentes tipos de cáncer los cuales incluyen vejiga, particularmente los usuarios de pioglitazona. Otros tipos de cáncer incluyen próstata, páncreas, mama y colorectal.

Retinopatía diabética.

Los pacientes con diabetes usualmente desarrollan complicaciones oftalmológicas tales como anormalidades corneales epiteliales, glaucoma, rubeosis iridis, cataratas y neuropatías. La más común y la que tiene el mayor porcentaje de ceguera de entre estas complicaciones es la retinopatía diabética. En México la retinopatía diabética esta presente hasta en el 40% de los pacientes con diabetes, es la primera causa de ceguera legal y debilidad visual en la población económicamente activa. De estos pacientes el 27% de quienes han tenido diabetes por 5-10 años y 71-90% de los que han tenido diabetes por más de 10 años tienen algún grado de retinopatía. Después de 20-30 años la incidencia

aumenta a 95% y aproximadamente 30 a 50% de estos pacientes tienen retinopatía diabética proliferativa.¹⁹

El mecanismo exacto por el que la diabetes mellitus causa retinopatía diabética todavía no es claro sin embargo se han postulado varias teorías que explican el curso y la historia natural de la enfermedad.

Hormona de crecimiento:

La hormona de crecimiento parece tener un papel importante en el desarrollo y progresión de la retinopatía. La retinopatía diabética ha demostrado ser reversible en mujeres que tuvieron síndrome de Sheehan (necrosis hemorrágica de la glándula pituitaria). Es importante también tener en cuenta que la retinopatía diabética también ha sido diagnosticada en pacientes con hipopituitarismo.²⁰

Plaquetas e hiperviscosidad sanguínea

Se han descrito una variedad de anormalidades hematológicas en el paciente con diabetes tales como aumento de la agregación eritrocitaria, disminución de la flexibilidad de los eritrocitos, aumento de la agregación y adhesión plaquetaria lo cual predispone a una circulación sanguínea lenta, daño endotelial y oclusión capilar focal. Lo anterior ocasiona isquemia de retina que a su vez contribuye al desarrollo de la retinopatía diabética.²¹

Aldosa reductasa y factores de neovascularización

La DM2 causa un metabolismo anormal de la glucosa como resultado de disminución de los niveles y el efecto de la insulina. El incremento en los niveles sanguíneos de glucosa se piensa que tiene efecto estructural y fisiopatológico en los capilares retinianos causando se sean anatómica y funcionalmente incompetentes. Un persistente incremento en los niveles de glucosa deriva en una desviación metabólica a la **vía de la aldosa reductasa** en ciertos tejidos, donde la glucosa se convierte en sorbitol y la galactosa en dulcitol. Los pericitos intramurales de los capilares retinianos se ven afectados por el incremento en los niveles del sorbitol y eventualmente los lleva a una pérdida de su función primaria

(autoregulación de los capilares retinianos). Esto resulta en una debilidad y eventual saculación de las paredes de los capilares (microaneurismas) los cuales son los signos más tempranos de la retinopatía diabética.²²

La ruptura de los microaneurismas resulta en hemorragias retinianas que pueden distribuirse en las capas más superficiales (hemorragias en flama) o en capas más profundas de la retina (hemorragias en punto y mancha). De igual forma el aumento en la permeabilidad de estos vasos resulta en fuga de fluido y material proteínico que clínicamente se observa como engrosamiento de la retina y exudados duros bien definidos. Si el edema y la exudación involucra la mácula el síntoma principal es la disminución de la visión central.²³

Edema macular

El edema macular es la causa más común de pérdida visual del paciente con retinopatía diabética no proliferativa. Sin embargo no es excluyente de los pacientes con neovascularización. Una teoría que explica el desarrollo de edema macular se enfoca en el incremento de los niveles del diacilglicerol derivada de la desviación en las vías metabólicas secundaria al exceso de glucosa. Se piensa que activa a la proteína cinasa C que a su vez afecta la dinámica de la circulación sanguínea de la retina especialmente la permeabilidad y el flujo llevando a fuga de líquido y edema de retina.²⁴

Hipoxia

Conforme la enfermedad avanza se pueden observar cierres de los capilares de la retina lo que genera hipoxia e isquemia de la capa de fibras nerviosas, las cuales clínicamente se pueden observar como exudados algodonosos o pseudoexudados. Estos últimos están asociados con estasis en el flujo axoplasmico. Conforme la hipoxia continua y se hace extensiva se inician mecanismos compensatorios para proveer suficiente oxígeno a los tejidos y puedan cumplir sus funciones metabólicas. En este punto se observan anomalías en el calibre de las venas tales como arrosamiento venoso, asas y dilatación significativa de las paredes venosas lo que incrementa la hipoxia. Las

anormalidades microvasculares intraretinianas (AMIR) representan ya sea el crecimiento de nuevos vasos o una remodelación de los vasos preexistentes por la proliferación de las células endoteliales dentro de los tejidos retinianos y actúa como una derivación a través de las áreas no perfundidas.²⁵

Neovascularización

Cuando aumenta la isquemia retiniana se activa la producción de factores angiogénicos que estimulan la formación de nuevos vasos. La matriz extracelular se destruye mediante la activación de proteasas y nuevos vasos surgen principalmente de las vénulas retinianas que penetran la membrana limitante interna y forman la red de capilares entre la superficie interna de la retina y la cara posterior de la hialoides.

La neovascularización se observa clínicamente en las áreas de limitación entre la retina isquémica y no isquémica y más comúnmente ocurre a lo largo de las arcadas vasculares y del nervio óptico. Los nuevos vasos crecen en la superficie de la retina hacia la cara posterior de la hialoides. Estos nuevos vasos son frágiles y altamente permeables. Por efecto de las tracciones vítreas estos vasos se rompen ocasionando hemorragias en la cavidad vítrea y el espacio prerretiniano.

²⁵

Inicialmente estos nuevos vasos están asociados a una escasa formación de tejido fibrogliial sin embargo conforme la densidad de neovasos aumenta también lo hace la formación de tejido fibroso. En estadios tardíos los vasos pueden involucionar dejando solo la red avascular e tejido fibroso que esta adherida tanto en la superficie de la retina como a la cara posterior de la hialoides. Conforme el vítreo se contrae ejerce tracción en la retina a través de estas conexiones fibrogliiales lo que genera edema, heteropía retiniana y desprendimiento de retina traccional como regmatógeno (mixto).²⁶

Factores de riesgo y etiología:

Duración de la enfermedad.

En los pacientes con DM tipo 1 no se observan cambios clínicos importantes en los primeros cinco años posteriores al diagnóstico. Después de 10 a 15 años, 25 al 50% de los pacientes muestran algún signo de retinopatía. Esta prevalencia se incrementa del 75 al 95% posterior a 15 años y se aproxima al 100% después de 30 años de la enfermedad. La retinopatía diabética proliferativa es rara en la primera década en los diabéticos tipo 1, se presenta en el 14 al 17% hacia los 15 años del diagnóstico y se incrementa de forma continua a partir de ahí. En los pacientes con DM tipo 2 la incidencia de la retinopatía diabética se incrementa conforme a la duración de la enfermedad. De los pacientes 23% tienen retinopatía diabética no proliferativa entre los 11 y 13 años de diagnóstico, y se eleva hasta 40% de los 14 a los 16 años. Más del 60% la presentan posterior a los 16 años de diagnóstico.²⁷

Hipertensión y dislipidemia:

La hipertensión arterial sistémica asociada a nefropatía diabética correlaciona con la presencia de retinopatía diabética. Independientemente de lo anterior la hipertensión complica el cuadro por los cambios hipertensivos en la vasculatura de la retina que con los cambios propios de la retinopatía diabética afecta aun más el flujo sanguíneo de la retina.²⁸

El control adecuado de los niveles de lípidos en sangre pueden resultar en menor fuga y exudado de los vasos sin embargo la razón no es clara.

Epidemiología:

La DM2 es responsable por aproximadamente 8000 casos de ceguera al año, aproximadamente 12% de las causas de ceguera a nivel mundial, siendo esta la primera causa. El índice es aun más alto en ciertos grupos étnicos. Se reporta un aumento entre los Nativos Americanos, Hispánicos y Afroamericanos.

Tanto mayor sea la duración de la diabetes desde el diagnóstico hay un mayor riesgo de desarrollar retinopatía diabética y sus complicaciones, incluyendo edema macular diabético o retinopatía diabética proliferativa.³⁰

Cuadro clínico:

En las etapas iniciales de la retinopatía diabética, los pacientes son generalmente asintomáticos; sin embargo en etapas más avanzadas de la enfermedad los pacientes pueden referir miodesopsias, visión borrosa, metamorfopsias y pérdida progresiva de la visión. El examen oftalmológico deberá ser completo bajo dilatación pupilar en donde se encuentran los siguientes signos:

Microaneurismas:

Son el dato clínico más temprano de la retinopatía diabética y ocurre secundario a la evaginación de las paredes capilares secundaria a la pérdida de pericitos. Se observan como pequeños puntos rojos en las capas más superficiales de la retina, en el lumen del microaneurisma se puede observar fibrina y acumulo de eritrocitos. Una ruptura de un microaneurisma genera hemorragias en punto y flama.

Hemorragias en punto y mancha (microhemorragias):

Como resultado de la ruptura de microaneurismas en las capas más profundas de la retina tales como la nuclear interna y la plexiforme externa. Clínicamente son similares a los microaneurismas.

Hemorragias en flama:

Son hemorragias que tienen configuración de astilla y estas ocurren en las capas superficiales de la capa de fibras nerviosas.

Edema de retina y exudados duros:

Son causados por la ruptura de la barrera hemato-retiniana permitiendo exudado de proteínas séricas, lípidos y proteínas de los vasos.

Manchas algodonosas:

Son áreas de infarto de la capa de fibras nerviosas por oclusión de las arteriolas precapilares. Con el uso de la angiografía por fluoresceína se observa que no hay perfusión capilar. Usualmente se encuentran cercanos a los microaneurismas y a áreas de aumento de la permeabilidad capilar.

Asas venosas y áreas de arrosamiento venoso.

Frecuentemente se encuentran adyacentes a áreas de retina no perfundida y reflejan un incremento en la isquemia de retina. Su presencia es el dato de progresión a retinopatía diabética proliferativa más importante.

Anormalidades microvasculares intrarretinianas:

Son lechos capilares remodelados sin cambios proliferativos. Estas áreas no fugan y se encuentran en los bordes de las retinas no perfundidas. ³⁰

Edema macular diabético:

El edema macular es la causa más frecuente de disminución de la visión del paciente con diabetes. Se han reportado una incidencia de hasta 75000 casos al año. Este se origina de daño funcional y necrosis de los capilares retinianos. Los criterios para diagnosticar edema macular clínicamente significativo son:

- Engrosamiento de retina localizado a 500 micras o menos del centro de la zona avascular foveal
- Exudados duros con engrosamiento de retina localizado a 500 micras o menos del centro de la zona avascular foveal.
- Engrosamiento de retina de un área de disco o maor localizado a un diámetro de disco de la zona avascular foveal. ³²

Retinopatía diabética no proliferativa:

La clasificación de la retinopatía diabética no proliferativa se describe de la siguiente manera:

- Leve: presencia de al menos un microaneurisma, este refleja los cambios estructurales en la retina causada por el efecto de la DM2.
- Moderada: Incluye la presencia de hemorragias, microaneurismas y exudados duros en 2-3 cuadrantes.
- Severo: Se caracteriza por hemorragias y microaneurismas en 4 cuadrantes, dos cuadrantes con arrosamientos venosos y por lo menos un cuadrantes con anomalidades microvasculares intrarretinianas. ³¹

Retinopatía diabética proliferativa:

La neovascularización o aparición de neovasos es el dato más característico de esta etapa de la enfermedad. Las hemorragias subhialoides se observan como sangre empaquetada en el espacio potencial entre la retina y la cara posterior de la hialoides. Aparece la forma de un bote por lo que se le conoce como hemorragia navicular o subhialoidea. La hemorragia vítrea aparece como una opacidad difusa en la que se pueden observar coágulos sanguíneos flotando. El tejido fibrovascular usualmente está asociado al complejo de neovasos y también puede aparecer con vasos exangües. Los desprendimientos de retina traccionales usualmente se observan como una retina inmóvil, poco flexible y cóncava, se pueden observar regmas de retina lo que hace lo convierte en un desprendimiento de retina mixto. La tracción retiniana también puede ser causa de edema macular originada por tracción retiniana lo suficiente para elevar el epitelio pigmentado de la retina.

La retinopatía proliferativa se clasifica como de alto y bajo riesgo.

En la de alto riesgo se observa neovasos de un tercio a medio disco o mayor de la papila óptica, presencia de hemorragia vítrea o subhialoidea.

Se pueden observar neovasos en periferia mayores a medio diámetro de disco asociado también a hemorragia vítrea.³¹

Estudios paraclínicos diagnósticos:

El riesgo de desarrollar retinopatía diabética a 10 años es mayor en pacientes con glucosa en ayuno mayor a 108mg/dL y HbA1c mayor a 6%. Por lo que para el control óptimo de la DM2 y la retinopatía diabética se recomienda HbA1c en rangos entre 6-7%. Si estos niveles se mantienen, la progresión de la enfermedad se reduce sustancialmente.³³

La angiografía con fluoresceína es un estudio de imagen indispensable para el diagnóstico y tratamiento de la retinopatía diabética. Los microaneurismas aparecen como puntos hiperfluorescentes en fases tempranas de la angiografía y típicamente con fuga en fases tardías de la prueba. Las hemorragias en mancha y punto pueden ser distinguidas como puntos hipofluorescentes por bloqueo. Las áreas isquémicas se observan como parches oscuros de hipofluorescencia

homogénea rodeada por vasos sanguíneos ocluidos. Las anomalías microvasculares intraretinianas se evidencian por vasos colaterales que no fugan, usualmente se encuentran en los bordes de la retina isquémica. Los penachos neovasculares se tiñen por su alta permeabilidad, inician como áreas hiperfluorescentes que incrementan en tamaño e intensidad en las fases tardías de la prueba.³⁴

La tomografía de coherencia óptica (OCT) se utiliza para determinar el grosor de la retina y la presencia de edema así como de tracción vítreo retiniana. Este examen de imagen está más enfocado en el diagnóstico y manejo del edema macular diabético y el edema macular clínicamente significativo. En caso de que haya opacidad de medios se recomienda el uso de ecografía ocular modo B.³⁵

Tratamiento:

Se ha descrito que pacientes recién diagnosticados con DM2 tuvieron un menor riesgo de retinopatía cuando tenían un control glicémico y de presión arterial sistémica. Una disminución de 1% de la HbA1c reduce el riesgo de retinopatía por 31% y una reducción de 10mmHg en los niveles de presión arterial sistólica reduce la aparición de hemorragia vítrea y la necesidad de aplicación de fotocoagulación en un 11%.³⁶

La fotocoagulación es un tratamiento instaurado a principio de 1970s el cual provee una modalidad de tratamiento no invasivo con un índice relativamente bajo de complicaciones y que ha reportado éxito en la contención de la retinopatía diabética. La terapia involucra la creación de necrosis coagulativa focal usando un rayo de luz de alta energía enfocada. La fotocoagulación panretiniana (PRP) es el tratamiento de elección para la retinopatía diabética proliferativa. Consta de aplicar quemaduras de láser focalizado en toda la retina sin involucrar el área macular ni los vasos sanguíneos. Se utiliza una parrilla con quemaduras de 200 a 500micras separadas por una distancia de disparo entre cada una, se debe evitar disparar a los neovasos para evitar hemorragias. El procedimiento continúa hasta alcanzar de 1200 a 1500 disparos y se puede repetir en dos o 3 sesiones.³⁷

El mecanismo terapéutico de la PRP no está totalmente entendido pero se cree que mediante la necrosis de la retina hipóxica disminuye la producción de factores vasoproliferativos como el VEGF reduciendo así la neovascularización. Otra teoría dice que la PRP genera un incremento de la difusión de oxígeno desde la coroides suplementando la circulación de la retina. Al eliminar la retina periférica sana, hay una redistribución del flujo sanguíneo hacia la retina central. El aumento del oxígeno genera una regulación negativa de los factores vasoproliferativos y por tanto la producción de neovasos.³⁷

La vitrectomía puede ser necesaria en casos de hemorragia vítrea mayor de 6 meses de evolución (donde la visión del polo posterior no es posible por la opacidad de medios), desprendimiento de retina traccional, desprendimiento de retina mixto (una combinación de traccional con regmatógeno) o una membrana epirretiniana con tracción vítreo-retiniana. El objetivo de la cirugía es remover la sangre para permitir la evaluación y posible tratamiento del polo posterior, liberar las fuerzas traccionales que desprenden la retina y aplicar tratamiento directo con fotocoagulación para disminuir la neovascularización.³⁸

Cuando se retrasa el tratamiento el seguimiento debe ser por ecografía modo B para vigilar que no haya desprendimiento de retina macular.

Cuando no hay medios claros para aplicar fotocoagulación está indicada la aplicación de crioterapia externa. El principio terapéutico es el mismo. Destrucción de tejido retiniano periférico para redistribución de flujo e inducir una adhesión corioretiniana lo cual incrementa el aporte de oxígeno haciendo una regulación negativa de los factores vasoproliferativos.³⁹

Seguimiento

La frecuencia del seguimiento se determina por la fase de la retinopatía y el índice de progresión a retinopatía diabética proliferativa. Solo el 5% de los pacientes con retinopatía diabética no proliferativa leve progresan a RDP a un año sin seguimiento. Estos pacientes deben ser vigilados de cada 6 a 12 meses. El 27% de los pacientes en el grupo de moderado progresarán a RDP en un año por lo que se deben vigilar de cada 4 a 8 meses. Más del 50% de los pacientes con retinopatía no proliferativa severa evolucionará a RDP en un año y de estos el

75% alcanzara el grado de con características de alto riesgo a los 5 años por lo que se deben vigilar de cada 2 a 3 meses. Cualquier estadio asociado con edema macular debe ser tratado inmediatamente con observación bimestral para valorar el estado de la macular y prevenir la perdida visual irreversible. ⁴⁰

La Academia Americana de Diabetes publicó las siguientes recomendaciones respecto al manejo de la retinopatía diabética. ⁴¹

- Optimizar el nivel glucémico para reducir el riesgo o disminuir la progresión de la retinopatía diabética.
- Optimizar la presión arterial y el control lipídico para reducir el riesgo o disminuir la progresión de la retinopatía diabética.
- Los diabéticos tipo uno deben iniciar su revisión oftalmológica completa dentro de los primeros 5 años a partir del diagnóstico de la enfermedad.
- Los diabéticos tipo dos deben iniciar la revisión oftalmológica completa al tiempo que se realiza el diagnóstico de la enfermedad.
- Si no hay evidencia de retinopatía y los controles de glucemia central están dentro de rangos normales se debe considerar un examen anual. En caso de que haya algún dato de retinopatía diabética el examen oftalmológico deberá ser más frecuente.
- Las mujeres con diagnóstico de DM tipo 1 o 2 que planeen en embarazarse o ya estén embarazadas deben ser orientadas sobre el riesgo de presentar o desarrollar retinopatía diabética.
- Los exámenes oftalmológicos deben realizarse antes del embarazo o en el primer trimestre en pacientes con diagnóstico preexistente de DM y luego se debe realizar en cada trimestre y posterior a un año posterior al parto.
- Realizar la referencia oportuna a pacientes con edema macular o retinopatía diabética no proliferativa severa.
- El estándar tradicional de tratamiento es la fotocoagulación panretiniana y esta indicada para disminuir la perdida visual en pacientes con retinopatía diabética proliferativa con características de alto riesgo y en algunos casos no proliferativa severa con inminencia de neovascularización.

- Inyecciones intravítreas de inhibidor de factor de crecimiento endotelial vascular se ha mostrado no ser inferior a la panfotocoagulación y esta indicado en pacientes con retinopatía diabética proliferativa.
- Inyecciones intravítreas de inhibidor de factor de crecimiento endotelial vascular están indicados en el edema macular clínicamente significativo.
- La presencia de retinopatía diabética no es una contraindicación para la terapia con aspirina como cardioprotector y no incrementa el riesgo en hemorragia de retina.

BIOMARCADORES:

Las enfermedades con una fisiopatología altamente compleja tales como el cáncer, la diabetes y sus complicaciones están aumentando en incidencia y prevalencia a lo largo del mundo. Debido a esto se están desarrollando biomarcadores capaces de modificar y predecir la clínica de la enfermedad.⁴²

Un biomarcador se define como una molécula detectada en fluidos o tejido corporales que están asociadas a un proceso en específico (fisiológico o fisiopatológico) de una enfermedad. Dependiendo del uso del biomarcador este se puede clasificar en las siguientes categorías:⁴²

- Diagnóstico para la detección de la enfermedad
- Pronóstico que representa la predicción del curso de la enfermedad.
 - Recurrencia, progresión y sobrevida
 - Predictivo en respuesta al tratamiento

En referencia a las neoplasias, el diagnóstico en los estadios más tardíos generalmente resulta en un peor pronóstico clínico. Por lo que el objetivo de los biomarcadores en cáncer es el de diagnosticar en etapas tempranas y de medir pronóstico en las diferentes etapas. Nuevos biomarcadores pronósticos pueden ayudar a los clínicos a seleccionar una estrategia terapéutica óptima e individualizada para cada paciente y facilitar la predicción de la respuesta a cada tipo de tratamiento específico.⁴³

El descubrimiento de nuevos biomarcadores es un proceso que involucra múltiples parámetros y su aplicación a la rutina clínica necesita una consideración apropiada de múltiples factores.

El proceso de desarrollo de biomarcadores en respuesta a necesidades clínicas incluye varios pasos: ⁴⁴

- Descubrimiento
- Verificación
- Validación

Desde hace más de 40 años la investigación traslacional han presentados nuevos biomarcadores con utilidad clínica con el objetivo de mejorar el manejo de enfermedades, especialmente aquellas con alto impacto socioeconómico como el cáncer o la diabetes mellitus. Aun cuando las plataformas analíticas se han expandido especialmente en el caso de la espectrometría de masas, la gran mayoría de los candidatos a biomarcadores publicados no son puestos en práctica en la clínica por diversas razones. La falta de estándar de oro puede ser un retraso importante ya que no es posible hacer una comparación de los potenciales biomarcadores contra una prueba ya validada. Actualmente se ha propuesto resolver esto proponiendo una fórmula matemática en el ajuste de la covarianza. ⁴⁵ Muchos otros factores causantes han sido reportados para aclarar las discrepancias en relación con la fisiopatología de la enfermedad o el flujo de desarrollo del biomarcador, entre estos problemas se han reportado varios niveles de variabilidad que genera la misma heterogeneidad de la enfermedad. La falta de biomarcadores validos es resultado de un preparación en el descubrimiento y la fase de validación. Por esta razón se debe diseñar cuidadosamente un plan de desarrollo de biomarcadores desde su descubrimiento hasta su verificación y posterior validación. Al mismo tiempo un conocimiento actualizado del trasfondo clínico es necesario para apuntar a las necesidades clínicas principales en su abordaje. ⁴⁶

Las partes críticas consideradas durante el diseño del estudio están representadas en la figura X. Un biomarcador a priori solo es aplicable en un contexto específico, para el cual su desempeño ya ha sido evaluado.

Un objetivo más allá de los anteriormente expuestos es la investigación de indicadores de pronóstico para respuesta a tratamiento. La introducción de guías de apoyo en diferentes etapas de los se ha propuesto la evaluación de la calidad de los biomarcadores y las normas para reportar e informar estudios de biomarcadores.⁴⁷

Toma de muestras para análisis

Los fluidos biológicos pueden ser clasificados en dos diferentes categorías basados en su proximidad al órgano de estudio. Los fluidos biológicos como el líquido cefaloraquídeo por su íntima proximidad al cerebro permite definir biomarcadores específicos aunque la toma de muestra es de manera invasiva. En contraste encontramos los fluidos de segunda categoría los cuales corresponden a los fluidos corporales que se encuentran en grandes cantidades tales como la orina. Su abundante cantidad y la forma no invasiva de recolección es la mejor ventaja para estudios de biomarcadores. El defecto para el análisis de este tipo de fluidos biológicos es su contenido heterogéneo, especialmente por la presencia de compuestos que interfieren con la lectura.⁴⁸

Se sugiere para limitar la variabilidad una adecuada evaluación y aplicación de protocolos ya estandarizados de estudio.⁴⁹

Diseño del estudio y evaluación analítica de las muestras.

La ejecución de los parámetros de la plataforma analítica deben ser bien descritos y haber pasado por un proceso de control de calidad. El desempeño de un biomarcador frecuentemente es definido por su sensibilidad y especificidad. La sensibilidad en este contexto se define como el porcentaje de resultados positivos verdaderos y la especificidad al porcentaje de negativos verdaderos.⁵⁰

Un cuidadoso diseño del estudio de acuerdo a las principales necesidades clínicas es fundamental. Lo ideal es que el estudio iniciar sea realizado en una cohorte predefinida y estudiada para su toma de muestra, manejo y análisis de acuerdo a los lineamientos de los protocolos de análisis. Posteriormente la confirmación de los resultados se deberá enfocar en un estudio prospectivo , multicentrico de

población en riesgo. Siguiendo los lineamientos anteriores aumenta sustancialmente la posibilidad que el candidato a biomarcador sea considerado para introducirlo a la práctica clínica.⁵¹

Consideraciones técnicas para el desarrollo y análisis de los biomarcadores.

La complejidad del fluido biológico puede generar la necesidad de combinar diferentes técnicas tales como técnicas de fractura. En general los requerimientos básicos para seleccionar una metodología son: ⁵²

- Facilidad de uso
- Robustez
- Alta precisión
- Alto desempeño

El flujo de trabajo en el estudio de biomarcadores se divide en 3 partes principales:

- Descubrimiento
- Verificación
- Validación

Descubrimiento de los biomarcadores:

La identificación de los diferentes candidatos a biomarcadores es el primer paso para la implementación clínica de la prueba. En la fase de descubrimiento se pueden mencionar dos enfoques diferentes: un enfoque basado en el conocimiento en donde la selección de los candidatos a biomarcadores se basa en los mecanismos moleculares existentes subyacentes al inicio o progresión de la enfermedad, como alternativa, un enfoque imparcial que implica la identificación no dirigida de proteínas expresadas diferencialmente entre dos grupos analizados.

⁵³

La proteómica basada en técnicas de espectrometría de masas favorece el enfoque del descubrimiento de biomarcadores no dirigidos, lo que resulta en un incremento sustancial en nuevos candidatos a biomarcadores. Sin embargo debido a la cantidad limitada para el análisis de la muestra se reporta un alto índice de descubrimientos falsos en la expresión diferencial como resultado de

variabilidad inter e intra individuos. Posteriormente la confirmación de las diferencias detectadas y la subsecuente investigación del impacto de las enfermedades relacionadas con el biomarcador es necesaria. En general el flujo de trabajo de la proteómica clásica incluye la separación de proteínas usando técnicas basadas en gel o libres de el seguida por la identificación por espectrometría de masas.

Algunos aspectos que tienen que tomarse en consideración incluyen establecer procesos y plataformas bien caracterizadas así como evaluación de la variabilidad analítica. Se debe tomar en cuenta la forma en la que se puede analizar las muestras de acuerdo a su complejidad.⁵⁴

El espécimen más frecuentemente estudiado para el descubrimiento de biomarcadores son los fluidos corporales (plasma, orina, líquido cefaloraquídeo, lagrime) estos se caracterizan por la alta complejidad y rango dinámico de su concentración de proteínas. En el caso del plasma el rango dinámico excede los 10 ordenes de magnitud.

A pesar de los avances en las técnicas de espectrometría de masas los análisis apenas cubren un rango dinámico entre 3 y 4. Ya que los marcadores potenciales se encuentran en baja abundancia su detección se encuentra obstaculizada por la presencia de otras proteínas de gran abundancia. Esto es especialmente aplicado en plasma en el que mas del 95% del total del contenido proteico se forma de 5 abundantes proteínas.

Uno de los métodos recomendados es reducir la complejidad de la muestra. Esta técnica puede ser aplicada en varias partes del flujo de trabajo experimental. Las muestras pueden enriquecerse de fracciones celulares seleccionadas o tipos de proteínas específicos (basada en las modificaciones postranslacionales). Particularmente los de membrana, las proteínas de matriz nuclear, los de fosforilación de proteínas y las glicoproteínas que están reportadas como una fuente valiosa para la identificación de biomarcadores.⁵⁵

En el caso de estudios en plasma, la depleción de proteínas altamente abundantes como la albúmina o las IgG es ampliamente recomendada.

Hay ocasiones en la que la aplicación de técnicas de depleción seguida por análisis por shotgun no es suficiente para la identificación de la mayor parte de las proteínas de baja abundancia, adicionalmente otros problemas concernientes a la depleción incluyen la reproductibilidad, co-depleción de proteínas de interés, requerimiento de mayores insumos y selectividad de las proteínas de alta abundancia. Una alternativa para minimizar los problemas antes mencionados es el fraccionamiento extenso.⁵⁶

Sin embargo adicional a las técnicas antes mencionadas las técnicas de optimización son necesarias, estas incluyen la preparación de la muestra, separación cromatográfica así como el análisis en espectrometría de masas. Aparentemente las plataformas basadas en espectrometría de masas combinada con flujos de trabajos analíticos y optimizados permiten una cobertura más profunda del proteoma. En comparación con los procedimientos multidimensionales cuando se inicia con una menor cantidad de material de muestra, menos tiempos analíticos podemos encontrar un proceso costo efectivo beneficioso.⁵⁷

Verificación de biomarcadores:

La verificación es obligada para evaluar los hallazgos obtenidos en la fase de descubrimiento. Aunque en la fase de descubrimiento se utilicen los enfoques no dirigidos para definir algún candidato o un conjunto de candidatos para biomarcadores, la fase de verificación representa un enfoque enfocado para evaluación mas profunda de la sensibilidad, especificidad y capacidad predictiva del biomarcador. Aun más importante, la verificación se realiza en el espécimen biológicamente apropiado que puede ser usado posteriormente en la practica clínica. En general los estudios de verificación requieren poblaciones de pacientes más grandes que en la fase de descubrimiento.

Dependiendo del diseño específico de estudio la plataforma analítica puede ser la misma que en la fase del descubrimiento o puede variar con ensayos más específicos basados en espectrometría de masas o ensayos de unión a proteínas.

Plataformas bioinformáticas en proteómica clínica.

El conocimiento de los mecanismos biológicos es útil en la interpretación de los resultados de las pruebas proteómicas. La aplicación de técnicas informáticas para analizar la información asociada con biomoléculas a gran escala, se han establecido como una disciplina en que abarca un amplia área desde la biología estructural, la genómica hasta los estudios de expresión genética. Los datos biológicos a nivel de la “ómica” desde el transcriptoma a la proteómica y los perfiles metabólicos se están desarrollando a una gran escala y con una velocidad acelerada.⁶⁰

Para tanta información la ciencia informática se ha hecho indispensable en la investigación especialmente en lo referente a la administración de grandes cantidades de información y el sondeo de las dinámicas complejas observadas en la naturaleza.

Los principales objetivos de la bioinformática incluyen:⁶¹

- La organización de la información de manera que permita a los investigadores acceder a la información ya existente y aportar nuevos datos.
- El desarrollo de nuevas herramientas y recursos para integración y análisis de datos requeridos para empatar con modelos biológicos. (InAct, BioGrid, OMIM, HMDB)
- La aplicación de dichas herramientas en el análisis e interpretación de resultados basados en una significancia biológica. (String and Cytoscape, AmiGO, KEGG, DAVID)

En particular las bases de datos para proteómica, ontología genética y búsqueda de rutas así como la información del paciente contienen no solo datos altamente confidenciales sino que también tiene que estar bien organizada para que provea datos genuinos y de utilidad. Después del apoyo en información que fue capturada en diferentes bases de datos, el siguiente paso son los enfoques informáticos de manera sistémica para la integración de datos. Estos enfoques proporcionan los

medios de inferencia *in silico* y cambios analíticos en las interacciones y en la dinámica de los flujos de trabajo. Algunas de las herramientas de integración de las bases de datos de proteómica son: ⁶²

- Análisis de vías: KEEG, Ingenuity Pathway Analysis (www.ingenuity.com)
MetaCore (<http://host.genego.com/metacore.php>)
- Mapeo de las vías: Reactome, PathViso, BioCyc plugin
- Análisis de ontología genética: ClueGO, BiNGO, FuncAssociate
- Análisis de redes: GeneMania, DisGeNet, EnrichmentMap, NetAtlas, NetworkAnalyzer, KUPNetViz
- Mapeo de interactóma: iRefScape, MiMI, PanGIA, BioNetBuilder, Bisogenet, FunNetViz
- Análisis de metabolóma: IDEOM, MAVEN, MetaCore, Beilstein, mzMatch

Validación de candidatos a biomarcadores

El objetivo principal de la fase de validación es la evaluación de la utilidad clínica de los candidatos a biomarcadores. La validación debe ser realizado con una muestra grande, independiente y suficiente que refleje la heterogenicidad de la población blanco. Este proceso es obligatorio ya que la exactitud del diagnóstico en general se sobreestima en el modelo propuesto. Para demostrar la utilidad clínica, los estudios de validación deben ser guiados en un contexto específico y usado en la población blanco siendo dependiente de las necesidades clínicas de los biomarcadores, estos deben cumplir con diferentes requerimientos de desempeño clínico (sensibilidad y especificidad). La exactitud del biomarcador individual o el desempeño de un panel de biomarcadores puede ser medido por un análisis ROC (receiver operating characteristics). La curva ROC representa una curva de positivos verdaderos contra una curva de falsos positivos. ⁵⁴

La especificidad se define con el método 1-FPR. En este método el área bajo la curva se usa como indicador del desempeño de los biomarcadores en cuando a su habilidad de distinguir entre los pacientes control y aquellos afectados por la enfermedad. Es muy importante determinar la cantidad de falsos positivos y negativos de manera que se pueda establecer una clasificación optima de los

límites en cuanto al nivel de especificidad y sensibilidad. Los biomarcadores utilizados para cribado deben tener alta sensibilidad y más frecuentemente y más importante un bajo nivel de falsos positivos. Por otro lado las pruebas de diagnóstico específico requieren altos valores predictivos positivos. Debido al hecho que la sensibilidad y especificidad no proveen información sobre la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad, los valores predictivos de enfermedad tienen que ser evaluados. Sin embargo estos valores son dependientes de la prevalencia de la enfermedad y solo pueden ser medidos en estudios prospectivos. Todos los valores de falsos positivos y negativos independientemente del uso clínico tienen que ser considerados para la medición del índice riesgo beneficio.⁶³

Varios retos se encuentran en la etapa de validación estos incluyen la calidad de las muestras y su disponibilidad, los recursos económicos y los requerimientos de las agencias regulatorias.

Para asegurar la robustez del estudio, la validación se debe realizar en estudios multi céntricos o en cohortes selectas que representen la población blanco.

Teniendo en mente que los candidatos más promisorios deben ser probados en miles de muestras, la validación requiere metodología cuantitativa y de alto rendimiento. No todas las plataformas aplicables en las etapas previas pueden cumplir con los requerimientos. Cambiar las plataformas pueden ser necesarios: los biomarcadores descubiertos usando técnicas basadas en geles no pueden ser validados con las mismas técnicas principalmente por su limitado rendimiento. Por otro lado la espectrometría de masas sirve como un buen ejemplo de técnica pues puede ser aplicada en todas las fases del desarrollo del biomarcador. La alta reproductibilidad, alto rendimiento y relación costo beneficio es lo que le da estas ventajas. Estas características junto con la necesidad de desarrollar paneles de biomarcadores hacen que la espectrometría de masas sea una plataforma atractiva para el desarrollo de biomarcadores.⁶⁴

Las aproximaciones basadas en anticuerpos están considerados como el estándar de oro en la aplicación clínica ya que esta tecnología es ampliamente conocida. Sin embargo la aplicación de inmunoensayos frecuentemente se ve obstaculizada

por la falta de anticuerpos de buena calidad. Adicionalmente, el ensayo de ELISA permite la detección de un único antígeno, lo que es un inconveniente para los paneles de biomarcadores. El rango poco dinámico y el alto costo de desarrollo de los ensayos basados en ELISA indican una utilidad moderada de esta técnica en estudios de validación a gran escala. Para evadir algunas de las limitaciones antes mencionadas los inmunoensayos multianalíticos se han aplicado, estos incluyen los arreglos planares y los ensayos con micro esferas. En los ensayos planares se han usado diferentes anticuerpos en una superficie plana, mientras que en el la segunda los anticuerpo se inmovilizan con una variedad de micro esferas. Actualmente los anticuerpos son usados comúnmente como ligandos pero los aptámeros (oligonucleótidos) pueden ofrecer una alternativa novedosa.^{65, 66}

ANTECEDENTES

La retinopatía diabética es una enfermedad con un estado preclínico largo donde el paciente se mantiene asintomático (Diabéticos sin retinopatía y los diabéticos en estadio no proliferativo). Un biomarcador útil en estas etapas de la enfermedad puede ayudar a la estadificación del riesgo y así optimizar los recursos para propósitos de selección. Biomarcadores que predicen la progresión a formas de la enfermedad más severas pueden guiar el control de los factores de riesgo así como las intervenciones preventivas. Finalmente en formas tratables de la enfermedad, un biomarcador puede proveer información pronostica así como la respuesta a las diferentes modalidades de tratamiento.⁶⁷

Biomarcadores séricos de retinopatía diabética:

Hemoglobina glicosilada:

El marcador más estudiado dentro de los biomarcadores séricos es la hemoglobina glicosilada (HbA1c) y este sigue siendo el único biomarcador validado para incidencia y progresión. De acuerdo al estudio de control y complicaciones de diabetes (DCCT), una media de HbA1c de 7.2% en diabéticos

tipo uno en un periodo de 6.5 años reduce la incidencia y progresión de retinopatía diabética de un 54 a 76%. Por otro lado en pacientes diabéticos tipo 2 tienen una reducción del 25% cuando hay un buen control glucémico. ^{68a}

Biomarcadores relacionados con inflamación y disfunción endotelial

Dos marcadores de inflamación están reportados: Proteína C reactiva (CRP) e hiperhomocisteinemia. Estos tienen evidencia fuerte de asociación con incidencia y progresión de retinopatía diabética. La CPR es una proteína de fase aguda que se usa ampliamente en la practica clínica para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades inflamatorias agudas o crónicas. Un meta análisis de 22 estudios mostró que la CRP se encontraba aumentada en sujetos con RD con una diferencia media estandarizada de 0.22, 95% de intervalo de confianza y era más alta en pacientes con enfermedad proliferativa que en los que no era proliferativa.

⁶⁸

Se ha encontrado una asociación entre hiperhomocisteinemia asociada con retinopatía diabética como se muestra en un metaanálisis de 31 estudios en donde se encontraron altos niveles de homocisteina en la retinopatía del diabético tipo 1 pero no en el del tipo 2. ⁶⁹

Otros biomarcadores ligados con inflamación, disfunción endotelial o trombosis que han mostrado asociación con retinopatía diabética incluyen el factor de necrosis tumoral alfa, receptores solubles para TNF, amiloide sérico A, glicoproteína 130, moléculas de adhesión 1, E-selectina, laminina, Pentrexina 3, S100A12, anticuerpos antimieloperoxidasa, lectina ligadora de manosa (MBL), proteína ligadora de retinol 4 (RBP4), ADAMTS13, dimero d, inhibidor del activador de plasminogeno (PAI-1). ⁷⁰

Otras proteínas séricas:

Los productos de glicación avanzada son de particular interés ya que están directamente relacionadas con el proceso patogénico subyacente en la diabetes mellitus. Los productos de glicación se forman en condiciones de hiper glicemia o altos niveles de estrés oxidativo. Estas se han visto estar asociados a incremento

en el riesgo, incidencia y progresión de retinopatía diabética, probablemente por los efectos sobre las funciones de las células endoteliales.⁷¹

Otras proteínas séricas como el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), adiponectina y cistatina C se ha reportado estar asociado a la presencia y severidad de retinopatía diabética.⁷²

Biomarcadores proteómicos:

Las técnicas de análisis proteómico han permitido la identificación de proteínas diferenciales en diferentes estadios de la enfermedad y mantienen una promesa de descubrimiento de nuevos biomarcadores. Usando electroforesis de dos dimensiones (2DE) y espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI TOF MS), se han encontrado 5 proteínas con expresión diferencial involucrada en el transporte, transducción, reparto de oxígeno y respuesta inmunológica. La presencia de retinopatía diabética fue asociada con incremento en los niveles de proteína ligadora de retinol 1 (RBP1), el nucleosido difosfato asociado a X (NUD10) y neuroglobina (NGB) así como la disminución de la porción gamma 2 de la hemoglobina y CD160.⁷²

Otro estudio mostró que los pacientes con DM tienen incremento en los niveles de proteínas inflamatorias (glicoproteína 2 alfa rica en leucina), proteínas transportadoras (afamina y proteína ligadora de vitamina D), proteínas estructurales (gelsolina, citoqueratina 8), proteína arginina N metiltransferasa 5.⁷³

El incremento en los niveles de glicoproteína beta dos, una proteína involucrada en la coagulación también fue asociada con incremento en la severidad de la retinopatía diabética.⁷⁴ Ninguno de estos estudios se validaron en una cohorte independiente. El estado de los estudios de proteómica sigue siendo de naturaleza exploratoria, lo cual hace que de momento no sean útiles en la clínica.

Biomarcadores metabólicos:

Son productos finales de los procesos celulares. Se ha reportado que usando cromatografía de gas y espectrometría de masas en pacientes con retinopatía

diabética no proliferativa se observan niveles disminuidos de 1,5 anhidroglucitol y aumento de los niveles de 1,5 gluconolactona, ácido 2 deoxiribonico, ácido 3,4 dihidrobutirico, eritritol, ácido gluconico, manosa, ribosa y urea. ⁷⁵

El mapeo de las vías de estos metabolitos revelan un aumento significativo en la vía de la pentosa fosfato que es responsable de la generación de NADPH para prevenir el estrés oxidativo. Este estudio incluye una validación independiente en una cohorte en el sur de la India. Otros estudios tendrán que validar los resultados en otras poblaciones y otros grupos étnicos.

Adicionalmente se observa un incremento en las concentraciones de citosina, cistidina y timidina asociado a pacientes con retinopatía diabética comparado con aquellos que no la tienen. La cistidina fue la que tuvo una mayor área bajo la curva teniendo una sensibilidad y especificidad como biomarcador de 73.7 y 91.9% respectivamente. El mecanismo exacto que lleva a las complicaciones microvasculares en DM es complejo pero involucra un daño y disfunción en la membrana celular. ⁷⁶

Biomarcadores oculares en retinopatía diabética.

Moléculas angiogénicas en vítreo.

En la patogénesis y progresión de la enfermedad de la retina generada por diabetes se han reportado factores angiogénicos y antiangiogénicos involucrados con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) siendo este uno de los biomarcadores mejor conocidos y que se incrementa en pacientes con retinopatía diabética. En modelos tridimensionales, VEGF promueve la angiogénesis, induciendo la invasión de geles de colágeno por células endoteliales que forman estructuras capilares. Este efecto está ampliamente aumentado por el factor de crecimiento de fibroblastos, que de igual manera se incrementa en la retinopatía diabética proliferativa. ⁷⁷

El VEGF induce neovascularización en pacientes con retinopatía proliferativa por varios mecanismos; hipoxia y acumulo de productos de glicación avanzada en el vítreo activando diferentes vías de señalización. También tiene la habilidad de producir exudación vascular por la disminución de dos proteínas críticas en el

mantenimiento de las uniones endoteliales; la ocludina y la zonula ocludens tipo 1.⁷⁸

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) esta implicado en la retinopatía proliferativa; en cultivos se ha mostrado la estimulación, proliferación y quimiotaxis del epitelio pigmentado de la retina (RPE) actuando como un factor parácrino de crecimiento. Adicionalmente media la contracción del tejido fibrovascular lo que lleva a desprendimiento de retina traccional, también se ha visto induce la expresión de VEGF en cultivos celulares.⁷⁹

El incremento en los niveles de óxido nítrico (NO), factor de crecimiento de hepatocito (HGF), angiopoetina 2, CYR61 y CD200s se encuentran incrementados en pacientes con retinopatía diabética proliferativa. Por otro lado el IGF-1 que tiene efecto proliferativo en las células endoteliales de la retina se encontró disminuido en los pacientes con retinopatía proliferativa comparado con los controles.⁸⁰

Biomarcadores anti angiogénicos.

Si existe un incremento en los factores angiogénicos y una disminución de los factores antiangiogénicos, las células irán por un camino de neovascularización. Es importante considerar los niveles de los factores anti angiogénicos en los pacientes con retinopatía proliferativa. El factor derivado de epitelio pigmentado (PEDF) fue descrito como un factor con propiedades neuroprotectoras sin embargo existe evidencia que es un inhibidor natural de la angiogénesis en el vítreo en donde se encuentra en altas concentraciones. La avascularidad de la córnea y del vítreo se le atribuye al PEDF. Su secreción disminuye bajo condiciones de hipoxia lo que explica por que sus niveles están disminuidos en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa.⁸¹

El factor de crecimiento transformante beta (TGF b) se produce en el epitelio pigmentado de la retina y en los pericitos del endotelio de la retina. Actúa como un regulador del crecimiento porque puede ser inhibir o estimular la proliferación dependiendo del contexto biológico ocular. En fases tempranas de la retinopatía

diabética predomina el perfil antiangiogénico y conforme se va hacia retinopatía proliferativa va disminuyendo el TGF b. ⁸²

Biomarcadores inflamatorios:

Se han reportado que las citocinas proinflamatorias y otros marcadores como la proteína C reactiva (PCR) están elevados en las muestras de suero, humor vítreo, humor acuoso y lágrimas de pacientes con DR.⁸³⁻⁸⁷ Otros informes han demostrado que la supresión de algunas citocinas puede proteger de cambios patológicos en los capilares retinianos en modelos animales. ⁸⁸ todos esos estudios apoyan la hipótesis de que la RD se comporta como una enfermedad inflamatoria subclínica de bajo grado. Por tanto, la medición de diversas citocinas en pacientes con diferentes estadios de RD puede facilitar la propuesta de nuevos biomarcadores para su posterior validación en estudios mayor muestra o en cohortes de pacientes diabéticos y con retinopatía diabética. Los estudios previos de biomarcadores inflamatorios no han sido consistentes en sus conclusiones y pocos de ellos han estudiado el perfil inflamatorio en las diferentes etapas de la enfermedad.

Muchas citocinas juegan un papel en la fisiopatología de la RD y tienen múltiples interacciones que impactan en la patogénesis de esta complicación de la DM2. Por tanto, es importante estudiar el perfil de citocinas de cada fase de la RD para que podamos comprender la influencia de la inflamación en la fisiopatología de cada etapa.

El sistema "Citometric beads array" (CBA) ha brindado la posibilidad de analizar varias proteínas en un pequeño volumen de líquido como por ejemplo, muestras de lágrimas o humor acuoso.⁸⁹⁻⁹² El CBA utiliza citometría de flujo y utiliza micropartículas de tamaño uniforme para medir un panel de seis citocinas por prueba de forma simultánea en un volumen tan pequeño como 25-50µL. Es posible cuantificar una variedad de proteínas solubles e intracelulares, como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y proteínas fosforiladas.⁹³⁻⁹⁵ Además, los ensayos que utilizan CBA están validados para la medición de

citocinas de suero y cultivo de tejidos; sin embargo, este método también es útil para la medición de citocinas en sobrenadantes homogeneizados de órganos ⁹⁶.

Biomarcadores de la película lagrimal:

En la última década los biomarcadores protéicos para enfermedades oculares se han buscado en la lagrime. Es un método no invasivo y que es fácilmente accesible. La lagrime es una mezcla de proteínas, lípidos, sales, mucinas y otras moléculas orgánicas.

En retinopatía diabética se ha encontrado un incremento en la apolipoproteína A-1 ⁹⁷, los productos avanzados de glucosilación y glucosaminoglucanos ⁹⁸. Los pacientes con retinopatía diabética tienen incremento en la inmunoglobulina A y en los niveles de lisosimas, mientras que los niveles de lipocalina eran menores que en el grupo control. El contenido global proteico de la lagrime esta incrementado en pacientes diabéticos. ⁹⁹

El contenido puede ser examinado por diferentes técnicas incluyendo electroforesis, espectrometría de masas y arreglos de proteínas. Usando la técnica iTRAQ para los estudios de proteómica en lagrime se reportó un incremento significativo en lipocalina, lactotransferrina, lacritina, lisocima C, lipofilina A e inmunoglobulina lamda observado en los pacientes con retinopatía diabética proliferativa. ¹⁰⁰

Para cistatina S también fue encontrada significativamente elevada en el estadio no proliferativo. Usando espectrometría de masas y western blot se mostraron niveles disminuido de LCN-1 (barre lípidos y ácidos grasos de las superficies hidrofóbicas) y HSP 27 (proteína de choque térmico) en pacientes con retinopatía diabética en comparación con el grupo control. Por el contrario en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa se observó un nivel de B2M (presente en la superficie de todas las células nucleadas que interactúa y estabiliza la estructura terciaria del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1) más elevada en comparación con pacientes diabéticos sin retinopatía diabética y que los grupos controles.

La expresión de proteína de choque de calor HSP son diferentes en sangre y lagrime. A diferencia de las lagrimas, el nivel de HSP en la sangre se observa elevado.¹⁰¹

Limitaciones de los estudios actuales

Los reportes de nuevos marcadores muestran pistas significativas para entender el proceso patológico, mejorando el diagnóstico y el pronóstico y últimamente el bienestar del paciente. Algunos de estos marcadores, sin embargo, siguen siendo herramientas de investigación y no han podido incluirse a la práctica clínica. La mayoría de estos biomarcadores tanto sistémicos como oculares no han incrementado su valor y siguen sin tener replicación en cohortes independientes de manera que no han alcanzado valores en clínica importantes como lo es la HbA1c y la duración de la DM. La mayor parte de estos marcadores no se ha evaluado en modelos predictivos para retinopatía diabética. Biomarcadores nuevos para la evaluación de iniciativas de salud pública como programas de tamizaje o prevención primaria siguen ausentes.

A pesar de los estudios con metodología sólida y grandes tamaños de muestra, biomarcadores genéticos concluyentes no han sido encontrados. Un área de oportunidad en investigación en esta área se podría beneficiar del cambio de enfoque a candidatos para poder probar en cohortes independientes.

Marcadores oculares como VEGF y PDGF pueden servir potencialmente como biomarcadores para tratamientos presentes y futuros, pero los métodos para evaluar estos marcadores son invasivos y no prácticos para pacientes o clínicos.

102

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La retinopatía diabética es un problema de salud pública ya que es responsable por aproximadamente 8000 casos de ceguera al año, se calcula que es responsable de 12% de ceguera a nivel mundial, siendo esta la primera causa de ceguera prevenible. Se presenta hasta en 30% de todos los pacientes diabéticos. Los pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad (retinopatía diabética proliferativa) son los grupos vulnerables ya que tienen alta probabilidad de llegar a la ceguera legal (visión peor de 20/200 Snellen) al cabo de 6 meses. El daño físico genera una incapacidad laboral psicosocial con repercusiones a la calidad de vida y a la economía local y global.

Con el avance de las técnicas avanzadas para el análisis diferencial de proteínas en diferentes muestras biológicas combinado con el empleo de métodos de fraccionamiento, separación e identificación de péptidos y proteínas, así como de la bioinformática, se han identificado posibles biomarcadores pero sus resultados no han podido ser aplicados a la clínica por su falta de replicación en una población más numerosa heterogénea. Se requieren estudios que incluyan pacientes en diferentes estadios de la enfermedad, principalmente en etapas tempranas, para identificar candidatos biomarcadores y posteriormente validarlos en una muestra poblacional mayor.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es el perfil inflamatorio en suero de pacientes con retinopatía diabética secundaria a diabetes mellitus tipo 2 en sus diferentes etapas?

JUSTIFICACIÓN:

Identificando el perfil inflamatorio de citocinas presentes en las diversas etapas de la retinopatía diabética estas podrán utilizarse como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico de la enfermedad, así como de respuesta a las intervenciones terapéuticas. Además se hará posible la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

Estos resultados podrían ser útiles para sustentar futuras investigaciones clínicas, epidemiológicas y fisiopatológicas, que ayuden a identificar marcadores de riesgo temprano de complicaciones microvasculares asociados con algún grado de resistencia a la insulina. Los estudios enfocados a la identificación de posibles rutas causales para el desarrollo de retinopatía diabética son de alta prioridad para implementar medidas de prevención y control más específicas y eficientes para retardar la aparición de este tipo de complicaciones microvasculares con alto impacto en la calidad de vida de los pacientes con diabetes.

HIPÓTESIS

El perfil inflamatorio de citocinas en suero de pacientes con retinopatía diabética en diferentes estadios es diferente al perfil de citocinas de pacientes sanos.

OBJETIVO GENERAL

- Medir la concentración de citocinas inflamatorias de las principales respuestas inflamatorias CD4 + T helper en suero sanguíneo de pacientes mexicanos con RD en diferentes estadios.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar el perfil de citocinas inflamatorias en cada uno de los diferentes estadios de retinopatía diabética.
- Correlacionar el perfil de citocinas con parámetros clínicos IMC, HbA1c y creatinina sérica.
- Construir modelo de regresión lineal y regresión logística entre las diferentes variables.

METODOLOGÍA

Cálculo de tamaño de muestra:

Si el tamaño de la población es desconocido (pacientes que acuden a consulta de Oftalmología Integral del Instituto de Oftalmología durante el periodo de muestreo), y utilizando el cálculo basado en una distribución normal, se debe seleccionar una muestra con al menos 64 sujetos para calcular una proporción estimada de 37% (prevalencia más baja de los grupos) con un error aceptado de 10% y un nivel de confianza del 90% y un poder del 75%.

Artículo de referencia: Malik et al 2018 ¹⁰³

Se realizará la selección y evaluación clínica y oftalmológica de los sujetos participantes agrupándolos en los siguientes grupos:

- Grupo 1: Sujetos sin DM2 (n=16)
- Grupo 2: Sujetos con DM2 sin retinopatía (n=16)
- Grupo 3: Sujetos con DM2 y retinopatía no proliferativa (n=16)
- Grupo 4: Sujetos con DM2 y retinopatía proliferativa (n=16)

Criterios de inclusión y exclusión para los casos

Criterios de inclusión:

- Personas con DM2
- Edad ≥ 40 años de edad
- Género indistinto
- Paciente que reciba tratamiento para DM2
- Estudios de laboratorio sanguíneo completo: glucosa sérica, hemoglobina glicosilada, urea y creatinina

Criterios de exclusión:

- Enfermedades crónicas oculares: Glaucoma, degeneración macular asociada a la edad, síndrome de ojo seco, síndrome de Sjögren.
- Alta 40iopía

- Enfermedades inflamatorias oculares: Rosacea, queratitis, uveítis o conjuntivitis
- Enfermedades infecciosas sin actividad en los últimos 6 meses.
- Fotocoagulación panretiniana o aplicación de antiangiogénico por retinopatía diabética
- Retinopatías de otro origen
- Tratamiento oftalmológico quirúrgico previo intraocular
- Enfermedades sistémicas autoinmunes o neoplásicas.
- Insuficiencia renal secundaria a DM

Criterios de eliminación:

- Necesidad de tratamiento por complicaciones de retinopatía diabética
- Pérdida de seguimiento
- Retiro de consentimiento para el estudio.

Valoración clínica oftalmológica:

El examen oftalmológico incluirá: agudeza visual con y sin corrección (debido a que está reportado que los pacientes con alta miopía tienen un efecto protector ante la retinopatía diabética y esto puede ser un potencial sesgo), presión intraocular (descartar glaucoma neovascular, que es una de las complicaciones asociadas a retinopatía diabética), y exploración clínica detallada bajo dilatación pupilar.

Para la evaluación de la retinopatía, edema macular y para su estadificación se utilizará una cámara no midriática con fotografías de 45° x 40°. En resumen, se identificarán cambios microvasculares en la retina como microaneurismas, exudados, arrosamiento venoso y anomalías microvasculares intraretinianas (IRMAS).

La RD se clasificará según su severidad en no proliferativa (leve, moderada y severa) y proliferativa según la clasificación de ETDRS.

Análisis de citocinas proinflamatorias en suero sanguíneo.

Toma de Muestra de suero

Se tomarán 10 ml de sangre en tubos vacutainer con K2-EDTA 10.8mg BD y con inhibidores de proteasas, se dejará a temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente se centrifugarán a 1000 RPM por 10 min a 4 °C. Se recupera el sobrenadante en alícuotas de 500 µl, y se almacenan a -80 °C, hasta su uso.

Determinación de citocinas Th1/Th2/Th17 por Cytometric Bead Array (CBA)

Se utilizó un kit de CBA para la detección de citoquinas humanas Th1/Th2/Th17 (BD, San José CA, USA), para medir los niveles de las siguientes citoquinas: interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), Factor de Necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interferón-gamma (IFN- γ) e interleucina-17^a (IL-17^a) en una sola muestra de plasma. El rendimiento del kit ha sido optimizado para el análisis de las concentraciones fisiológicamente relevantes (niveles en pg/ml).

Para el ensayo se obtuvo el plasma de cada uno de los 4 grupos de estudio y se realizó al ensayo de CBA para la detección de citoquinas Th1 (IL-2, TNF, IFN- γ); Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) y Th17 (IL-17), siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron diluidas 1/16.

Antes de comenzar con el ensayo: Se prepararon los estándares siguiendo los pasos mencionados a continuación:

Se reconstituyó el estándar 15 minutos antes de realizarse las diluciones en cabina de flujo laminar con 2mL del diluyente del estándar. Se le dejó equilibrar durante al menos 15 minutos antes de hacer las diluciones. Se agitó para mezclar.

Se agregó 300µl del diluyente del estándar a tubos de vidrio con los siguientes rótulos: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256.

3. Se realizaron diluciones seriadas añadiendo 300µL de cada estándar al tubo siguiente. Se agitaron para mezclar entre cada transferencia. El tubo con el

estándar no diluido sirvió como la concentración del estándar más alto. El diluyente del estándar sirvió como la concentración cero (0pg/ml).

Se mezclaron los beads siguiendo los pasos mencionados a continuación:

- 1) Se determinó el número de tubos de ensayo (incluyendo estándares y controles necesarios para el ensayo.
- 2) Se agitó fuertemente cada tubo con la suspensión de beads de captura de 3 a 5 segundos antes de mezclarlos con las muestras.
- 3) Se agregó una alícuota de 10µL de cada uno de los beads de captura y se agitó la mezcla.

Para la realización propia del ensayo se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se mezclaron los beads de captura, de los cuales se agregaron solamente 50µL a cada tubo de ensayo.
- 2) Se añadió 50µL de las diluciones del estándar de las citoquinas Th1/Th2/Th17 a los tubos utilizados como controles.
- 3) Se añadió 50µL de cada muestra a los tubos respectivos.
- 4) Se agregó 50µL del reactivo de detección de las citoquinas humanas Th1/Th2/Th17 a todos los tubos de ensayo.
- 5) Se incubaron los tubos de ensayo durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz.
- 6) Se añadió 1mL del buffer de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 200g durante 5 minutos.
- 7) Se aspiró y descartó el sobrenadante de cada tubo de ensayo.
- 8) Finalmente, se añadió 300µL de solución de lavado a cada tubo de ensayo para re-suspender el sedimento de los beads.

La adquisición de datos se realizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur, dentro de las 24 horas post ensayo y los resultados fueron analizados por el software BDTM Cytometric Bead Array Software, versión 1.4.

Análisis estadístico:

Las características demográficas de los pacientes se describieron mediante medias y desviación estándar. Para evaluar la distribución de las variables estudiadas se utilizó la prueba de Shapiro Wilk. Dada la distribución de los datos, el análisis comparativo entre los diferentes grupos se realizó mediante pruebas no paramétricas: para analizar los valores con distribución no normal se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (para comparación de 2 grupos) y la prueba de Kruskal Wallis (para comparación de más de dos grupos); para analizar valores con distribución normal utilizamos la prueba T de student para muestras independientes y ANOVA. Para el análisis de correlación de valores con distribución normal utilizamos la prueba de correlación de Pearson y de valores con distribución no normal, la prueba de correlación de Spearman. El nivel aceptado de significancia se estableció en $p < 0.005$ después de la corrección de Bonferroni. La transformación logarítmica se utilizó para mejorar la normalidad de las citocinas y las concentraciones de factores inflamatorios. Todas las suposiciones para los análisis multivariados de covarianza (MANCOVA) se evaluaron antes de comparar las medidas de citocinas entre los cuatro grupos, el IMC se utilizó como covariable debido a que se ha reportado el impacto en los niveles de citocinas plasmáticas (Fong T, 2019)¹⁰⁴. Para la investigación de los efectos principales, se aplicó un ANCOVA post-hoc con IMC como covariable y corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Construimos un modelo de regresión lineal como referencia y un modelo logístico ordenado. Para evitar la sobrerrepresentación, calculamos los factores de inflación de la varianza (FIV) para cada variable. Ambos modelos incluyeron la gravedad de la RD como variable de respuesta. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico Stata (STATA / IC), versión 16 (IBM Inc. Chicago, IL, EE. UU.)

Aspectos Éticos:

Este estudio prospectivo se adhirió a la declaración de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) sobre estudios con sujetos humanos, se realizó de conformidad con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional

antes de iniciar el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado (Anexo 1) por escrito de todos los sujetos involucrados en este estudio.

RESULTADOS.

Datos clínicos y demográficos:

Se incluyeron en el estudio un total de 64 sujetos, 16 pacientes en el grupo control (Sin DM, Sin DR), 16 pacientes en el grupo DM2 sin retinopatía diabética (NDR), 16 en el grupo de retinopatía diabética no proliferativa (NPDR) y 16 en el grupo de retinopatía diabética proliferativa (PDR). Las características clínicas se enumeran en la Tabla 1.

No hubo diferencias estadísticas en el sexo, la edad o los años de diagnóstico. La HbA1c y el índice de masa corporal fueron sustancialmente más altos entre los grupos de retinopatía diabética (RDNP y RDP) en comparación con el NDR. La creatinina sérica se elevó considerablemente en el grupo RDP en comparación con los otros tres grupos de estudio. .

Análisis de citocinas séricas:

La comparación con los resultados de ANOVA post-hoc entre grupos y la significación después de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples se reporta en la Tabla 2.

Los pacientes del espectro DR mostraron concentraciones significativamente elevadas de citocinas IL-6, IL-8, IL-12, IL-17a y niveles de TNF α en comparación con el grupo de control.

Entre los grupos de diabéticos, los sujetos con retinopatía diabética proliferativa mostraron una concentración ligeramente menor de citocinas IL-6, IL-12, IL-17a que los grupos NDR y NPDR. Solo el TNF α fue significativamente más alto en este grupo en comparación con los demás. (Figura 1)

La IL-8 se consideró elevada solo en el grupo NPDR, para todos nuestros resultados y discusión posterior solo contabilizamos una diferencia significativa después de la corrección de Bonferroni.

MANCOVA y análisis post-hoc:

Al comparar los niveles de citocinas en suero entre el grupo Control, NDR, NPDR y PDR controlando por BMI, utilizando MANCOVA general se identificó una diferencia entre los grupos ($\Lambda = 0.0244$; $F(40,210) = 8.75$; $p < 0,0001$) y los niveles de citocinas; no encontramos una interacción con grupo estadístico * IMC ($\Lambda = 0.06$; $F(30,153) = 0.97$; $p = 0.52$). Utilizando ANCOVA post-hoc con IMC como covariable no se evidenciaron diferencias entre los grupos y los niveles de citocinas dependiendo de la covariable. (Tabla 3)

Análisis de correlación:

Cuando se analizó la correlación entre las características clínicas y la concentración de citocinas con la presencia y severidad de RD se observó una correlación estadística positiva con HbA1c ($\rho = 0.687$ con $p = 0.01$), IMC ($\rho = 0.815$ con $p = 0.001$) y creatinina sérica. ($\rho = 0,801$ con $p = 0,001$). De las citocinas séricas se observó una correlación positiva en IL-6 ($\rho = 0.304$ con una $p = 0.006$) y $TNF\alpha$ ($\rho = 0.408$ con una $p = 0.001$). El resto de las variables no mostró correlación estadística. El análisis de correlación se reporta en la Tabla 4.

Análisis de regresión lineal múltiple:

Todas las variables presentaron una independencia aceptable ($VIF < 5,0$) con una media de 2,44. Así, todos ellos fueron incluidos en ambos modelos de regresión.

La regresión lineal múltiple presentó una bondad de ajuste aceptable (R^2 ajustado = 0,857). Las variables TNF , HbA1c e IMC mostraron una relación significativa con la severidad de la RD ($p < 0.01$), así como con IL6, IL17 y Creatinina sérica ($p < 0.05$). Sin embargo, dado que la gravedad de la RD es una variable ordinal, construimos una regresión logística ordenada que también presenta una bondad de ajuste adecuada (R^2 ajustado = 0,637).

Este modelo mostró que IL1B, TNF e IMC están relacionados significativa y positivamente con la severidad de la RD ($p < 0.01$), al igual que la Creatinina ($p < 0.05$). (Tabla 5)

DISCUSIÓN:

La RD es una complicación que amenaza la visión en pacientes diabéticos. El daño microvascular e isquémico causado por la hiperglucemia y las vías metabólicas anormales conducen a la liberación de factores pro angiogénicos, inflamatorios e inmunológicos. Se han detectado concentraciones elevadas de diversas citocinas inflamatorias y mediadores angiogénicos en el humor vítreo, humor acuoso y el tejido retiniano. Hay informes de que las quimiocinas séricas están significativamente elevadas en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa al menos grave.^{105-106.}

En este estudio encontramos que IL-6, IL-12, IL-17a y TNF α mostraron diferencias significativas entre el grupo de control y los sujetos diabéticos. Las PDR exhiben concentraciones ligeramente más bajas de IL-6, IL-12 e IL-17a y concentraciones más altas de TNF α en comparación con NDR y NPDR También encontramos una correlación estadística positiva entre la presencia y la gravedad de la RD con los parámetros clínicos HbA1c, IMC, creatinina sérica y la concentración de citocinas IL-6 y TNF α . Estos hallazgos sugieren que los pacientes con diabetes y RD tienen un perfil inflamatorio crónico más fuerte en comparación con los sujetos no diabéticos.

Las citocinas son sintetizadas por los linfocitos, macrófagos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales, entre muchas otras células. Estas median las interacciones intercelulares en las reacciones inmunes, los procesos inflamatorios de fase aguda y están involucrados en las vías de la hematopoyesis.

Existen tres tipos de respuesta CD4 + T helper (Th) que promueve respuestas inmunes celulares y humorales y que están altamente asociadas con la inflamación en los fluidos y tejidos oculares.¹⁰⁷ Se producen IL-1 β , IL-2, IFN γ y

TNF α por respuesta Th1, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 son producidas por células Th2 e IL-17a por respuesta Th17.¹⁰⁸ El ensayo por CBA es capaz de analizar las citocinas antes mencionadas simultáneamente en un volumen tan bajo como 200 μ L en cada muestra. Esta técnica nos permite analizar el perfil de citocinas en cada etapa de la RD y puede contribuir a una mejor comprensión del proceso inflamatorio y su correlación con el desarrollo y progresión de la enfermedad.

No está clara la importancia de las citocinas circulantes para el desarrollo de RD o si pueden usarse como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico. Los estudios disponibles en esta materia han sido contradictorios en sus conclusiones.

Hang et al, midieron las citocinas en el plasma de pacientes con DM2 y DR, encontraron que MCP-1, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17, sCD40L, sIL -2R α y TNF- β aumentaron significativamente en el grupo diabético en comparación con los controles, mientras que Flt-3L, IL-1Ra, IL-3, IL-5 e IL-12 fueron menores en el grupo diabético en comparación con el grupo control. Cuando el grupo de diabéticos se subdividió por estadio de RD, Hang, et al., reportaron que el nivel plasmático de TNF- α estaba significativamente elevado en pacientes con retinopatía diabética proliferativa (PDR) en comparación con los niveles en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa (NPDR) y pacientes sin retinopatía diabética aparente (NDR).¹⁰⁹ También Koleva-Georgieva et al., midieron los niveles de IL-1 β , IL-6, TNF- α y VEGF reportando que los pacientes con RD mostraron niveles más altos de estas citocinas en comparación con los grupo no diabético, en sus conclusiones, estas citocinas mostraron una correlación positiva con la severidad de la RD.¹¹⁰

Mirza y col. midieron las citocinas IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8, adiponectina, resistina y leptina en una cohorte de pacientes con diabetes tipo 2 mexicano-estadounidenses. Sus datos indicaron que la diabetes en su conjunto estaba fuertemente asociada con niveles elevados de IL-6, leptina y TNF- α , mientras que un mal control de la glucosa se asoció positiva y linealmente con niveles altos de IL-6.¹¹¹

Cheung y col. midieron IL-2, IL-10, IL-12, IFN α y TNF de muestras de humor acuoso de pacientes diabéticos. Concluyeron que solo los niveles de IL-6 y VEGF eran significativamente más altos en pacientes diabéticos con retinopatía.¹¹² Todos estos estudios antes mencionados reportan resultados similares a los reportados en este estudio. Ha habido controversia con respecto a los perfiles de citocinas de pacientes con RD. Chen et al., Cuantificaron IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A , IL-22 y TNF α en suero de pacientes diabéticos en comparación con sujetos de control. Concluyeron que solo IL-22 mostró niveles significativamente más bajos en pacientes diabéticos, el resto de las citocinas no mostraron cambios significativos en los pacientes diabéticos en comparación con los controles. Lange et al., midieron las concentraciones vítreas y plasmáticas de 42 citocinas. Concluyeron que eotaxina, ligando Flt-3, oncogén relacionado con el crecimiento (GRO), IL-6, IL-8, IL-9, proteína 10 inducible por IFN (IP-10), citocina derivada de macrófagos (MDC), y VEGF mostró cambios significativos en el vítreo de sujetos con PDR.¹¹³

Marwaha y col. informaron que múltiples subconjuntos de células T están sesgados hacia la secreción de IL-17 en pacientes diabéticos tipo 1,¹¹⁵ Ao-Wang et al. informaron en un modelo animal que la IL-17a exacerba la patología similar a la DR mediante la promoción del deterioro funcional de las células de Müller a través de la señalización.¹¹⁶ Estos estudios apoyan nuestros hallazgos con respecto a los niveles más altos de IL-17a en el grupo de RD sugiriendo su participación en la fisiopatología de la RDP, pero de manera contradictoria, Nadeem et al. en un estudio transversal de casos y controles, informó que el nivel sérico de IL-17 se asoció inversamente con DM tipo 2 y DR35.

Morohoshi et al., Demostraron en un estudio in vitro que la secreción de IL-6 y TNF- α por los monocitos de sangre periférica puede ser estimulada por un entorno hiperglucémico.¹¹⁷ Esta podría ser la razón que explique por qué los pacientes con hiperglucemia mostraron un aumento de las concentraciones sanguíneas de estas dos citocinas. Además de esto, TNF α es una adipocitoquina; definidas como

moléculas que se secretan principalmente a partir de las células que forman el tejido adiposo. Estas adipocitocinas tienen actividad paracrina y endocrina, especialmente cuando el nivel de glucosa plasmática está elevado.

Finalmente, Maha Ali et al, reportaron en un modelo animal que la interrupción de IL-12 promueve la angiogénesis, la arteriogénesis y aumenta la recuperación del flujo sanguíneo en ratones diabéticos tipo 2.¹¹⁸ La disminución de IL-12 podría explicarse como una respuesta al ambiente isquémico generado por la fisiopatología de la RD.

Las condiciones diabéticas conducen a una elevación de la expresión de citocinas proinflamatorias dentro de la retina, lo que activa las células microgliales. En respuesta a un estímulo activador, la microglía inactiva sufre una serie de cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales estereotipados. La microglía activada estimula así un ciclo de inflamación que recluta leucocitos, causa ruptura vascular e induce directamente disfunción glial y muerte de células neuronales a través de la liberación de sustancias citotóxicas. Boss et al, informaron sobre varias citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y MCP-1) elevadas en los tejidos oculares en concentraciones aún más altas en ojos diabéticos con NPDR que con PDR activo.¹¹⁹ El aumento en estas citocinas producidas por microglía activada, células endoteliales, macroglia y más tarde incluso neuronas, resaltan el aumento de la actividad de estas citocinas inflamatorias en las primeras etapas de la RD y la progresión de la respuesta inflamatoria en todos los tipos de células de la retina¹²⁰. Uno de los primeros signos de estrés metabólico retiniano es la “up-regulation” de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) por las células gliales de Müller, una observación reportada clásicamente en modelos animales, así como en tejidos de pacientes diabéticos sin RD a RDNP leve. Este aumento constituye un mecanismo regulador negativo conocido de la señalización de citocinas, lo que sugiere que existen mecanismos contrarreguladores de la angiogénesis y la inflamación dentro del ojo.¹²¹

Esta “up-regulation” también se ha reportado en otros estudios de biomarcadores de DR, incluyendo estudios de microARN sérico (miR). Qin y col. examinaron el nivel de expresión de miR-126 en 42 pacientes con DM con RDNP, 39 pacientes

con DM con PDR y 44 pacientes con DM sin RD. La expresión relativa de miR-126 en el grupo PDR fue significativamente menor que en el grupo combinado NDR y NPDR. La regulación a la baja de miR-126 en PDR puede estar relacionada con el daño endotelial, ya que se ha informado que miR-126 proporciona protección para las células endoteliales vasculares⁴⁶.¹²²

La hiperglucemia y las vías metabólicas anormales son un factor común para todo el organismo dentro de los pacientes con DM2, provocan cambios patológicos no solo en el ojo, esta es la razón por la que se deben tener en cuenta los biomarcadores sistémicos clínicos.

Andreasson y col. reportaron un estudio retrospectivo que siguió a pacientes de 1993 a 2001, concluyeron que niveles más altos de HbA1c acortaron el tiempo de desarrollo de RD en pacientes con diabetes mellitus tipo 1.¹²³ Hermann et al. reportaron una investigación multicéntrica realizada en Alemania y Austria con más de 35,000 pacientes, este estudio concluyó que la variabilidad de HbA1c es relevante para el desarrollo de DR.³⁸ Kaštelan et al. En un estudio transversal que incluyó a 545 pacientes, reportó que el IMC en correlación con la HbA1c, el colesterol y la hipertensión parecen estar asociados con la progresión de la RD en la diabetes tipo 2.¹²⁴ La microangiopatía diabética es una complicación que no solo afecta a la retina sino también a los riñones y el sistema nervioso. Es posible que la fisiopatología de esta complicación esté mediada por las mismas citocinas producidas por varios tejidos y que circulan en la sangre. Xiao Zhang y col. en un estudio anidado de casos y controles que incluyó a 177 pacientes con retinopatía diabética en diferentes estadios, concluyó que la creatinina sérica y la variabilidad estimada de la tasa de filtración glomerular están significativamente asociadas con la presencia y severidad de la retinopatía diabética.¹²⁵ Xiao-Qian et al. publicaron un estudio observacional retrospectivo de 104 pacientes con nefropatía diabética (ND), concluyeron que los pacientes con ND sin RD pueden tener un daño renal menos grave y menos complicaciones diabéticas que aquellos con RD.¹²⁶ Los resultados de estos estudios apoyan la correlación positiva que se encontró en

nuestro estudio entre la presencia y gravedad de la RD y la HbA1c, el IMC y la creatinina sérica.

Una limitación de este estudio es un tamaño de muestra relativamente pequeño; Se necesitan estudios extensos con muestras más grandes para validar nuevos candidatos a biomarcadores clínicos con el fin de seleccionar blancos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos adecuados para el tratamiento de la retinopatía diabética.

CONCLUSIONES:

En resumen, el presente estudio demostró una concentración significativamente mayor de citocinas inflamatorias sistémicas que es consistente con un perfil proinflamatorio en pacientes con RD en todos los estadios. PDR mostró concentraciones de citocinas ligeramente inferiores a NDR y NPDR, excepto para el $TNF\alpha$ que tuvo la concentración más alta en comparación con los pacientes no diabéticos, los pacientes diabéticos sin RD y los pacientes con NPDR. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la RD se comporta como una enfermedad inflamatoria subclínica de bajo grado. Además, el presente estudio observó una correlación positiva y fuerte entre el estadio de RD y los parámetros clínicos que reflejan el estado metabólico de HbA1c, IMC, creatinina sérica y también con citocinas inflamatorias como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$. Estos datos refuerzan la evidencia de que un metabolismo con glucosa elevada puede conducir a un ambiente inflamatorio que contribuya al desarrollo y progresión de la RD.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas.

	CONTROL	NRD	RDNP	RDP	Valor P
Género (H/M)	5/11	8/8	6/10	7/9	0.24
Edad (años)	58.7 \pm 5.8	59.7 \pm 11.2	59 \pm 8.5	56.9 \pm 9.6	0.07
Tiempo de diagnóstico (Años)	NA	10.5 \pm 7	13.4 \pm 8	13.9 \pm 5.4	0.33
HbA1c (%)	NA	6.5 \pm 0.6	7.4 \pm 1.0**	7.8 \pm 0.8**	0.001
Índice de masa corporal	24.1 \pm 1.5	26.6 \pm 1.1	27.4 \pm 1.8*/**	28.8 \pm 1.6*/**	0.001
Creatinina sérica (mg/dL)	0.92 \pm 0.16	1.1 \pm 0.2	1.29 \pm 0.2	2.3 \pm 0.7*/**/**	0.021

La media + desviación estandar (SD) de la edad, tiempo de diagnóstico, HbA1c, IMC y creatinina sérica. Género Índice Hombre:Mujer. NRD= Sin retinopatía diabética. RDNP= Retinopatía diabética no proliferativa. RDP= Retinopatía diabética proliferativa. N.A.=Not available. * p<0.05 versus CONTROL group; ** p<0.05 versus NDR group; ***p<0.05 versus NPDR.

Tabla 2. Nivel de citocinas séricas por grupo

	CONTROL	NDR	NPDR	PDR	P value
IL-1 β	36.23 \pm 6.3	38.1 \pm 6.8	39.4 \pm 4.19	36.4 \pm 5.1	0.26
IL-2	42.2 \pm 5.2	44.2 \pm 6.2	41.1 \pm 4.4	42.0 \pm 6.5	0.37
IL-4	39.5 \pm 8	40.1 \pm 9.3	39.03 \pm 7.1	34.5 \pm 7.9	0.14
IL-6	23.9 \pm 7.7	46.09 \pm 9.6*	52.31 \pm 11.3*	42.39 \pm 8.7*/**	0.001
IL-8	15.85 \pm 16.7	7.5 \pm 4.49	5.9 \pm 6	8.5 \pm 9.7	0.055
IL-10	37.9 \pm 3.9	42.56 \pm 6.8	40.13 \pm 4.3	39.9 \pm 4.4	0.50
IL-12	49.7 \pm 9.5	30.7 \pm 12.2*	32.9 \pm 8.1*	33.5 \pm 7.5*	0.0001
IL-17a	28.8 \pm 7.7	50 \pm 11.3*	47.4 \pm 9.1*	38 \pm 7.3*/**/**	0.0001
TNF α	5.4 \pm 3.2	7.2 \pm 3.2	8 \pm 2.4	13.3 \pm 3.5*/**/**	0.001
IFN γ	4.7 \pm 2.2	3.8 \pm 2.4	3.5 \pm 2.1	3.6 \pm 1.6	0.275

La media + desviación estandar (SD) NRD= Sin retinopatía diabética. RDNP= Retinopatía diabética no proliferativa. RDP= Retinopatía diabética proliferativa. * p<0.005 versus CONTROL group; ** p<0.005 versus NDR group; ***p<0.005 versus NPDR

Tabla 3. Niveles de citocinas en suero comparado entre grupos con IMC como covariante

	CONTROL	NDR	NPDR	PDR	F	ANCOVA P value	F	ANOVA P value
IL-1 β	36.23 \pm 6.3	38.1 \pm 6.8	39.4 \pm 4.19	36.4 \pm 5.1	1.39	0.25	1.43	0.24
IL-2	42.2 \pm 5.2	44.2 \pm 6.2	41.1 \pm 4.4	42.0 \pm 6.5	1.16	0.33	0.93	0.43
IL-4	39.5 \pm 8	40.1 \pm 9.3	39.03 \pm 7.1	34.5 \pm 7.9	1.85	0.14	1.50	0.22
IL-6	23.9 \pm 7.7	46.09 \pm 9.6*	52.31 \pm 11.3*	42.39 \pm 8.7*	25.75	0.0001	34.70	0.0001
IL-8	15.85 \pm 16.7	7.5 \pm 4.49	5.9 \pm 6*	8.5 \pm 9.7	3.95	0.019	3.77	0.014
IL-10	37.9 \pm 3.9	42.56 \pm 6.8	40.13 \pm 4.3	39.9 \pm 4.4	2.47	0.068	2.45	0.069
IL-12	49.7 \pm 9.5	30.7 \pm 12.2*	32.9 \pm 8.1*	33.5 \pm 7.5*	17.17	0.0001	20.08	0.0001
IL-17a	28.8 \pm 7.7	50 \pm 11.3*	47.4 \pm 9.1*	38 \pm 7.3*/**/**	25.11	0.0001	26.25	0.0001
TNF α	5.4 \pm 3.2	7.2 \pm 3.2	8 \pm 2.4*	13.3 \pm 3.5*/**/**	7.17	0.0001	17.57	0.0001
IFN γ	4.7 \pm 2.2	3.8 \pm 2.4	3.5 \pm 2.1	3.6 \pm 1.6	1.29	0.28	1.88	0.141

Media + desviación estandar (SD) NRD= Sin retinopatía diabética. RDNP= Retinopatía diabética no proliferativa. RDP= Retinopatía diabética proliferativa. * p<0.008 versus CONTROL group; ** p<0.008 versus NDR group; ***p<0.008 versus NPDR.

Tabla 4. Correlación de características clínicas y la concentración de citocinas con la severidad de la RD. Cor

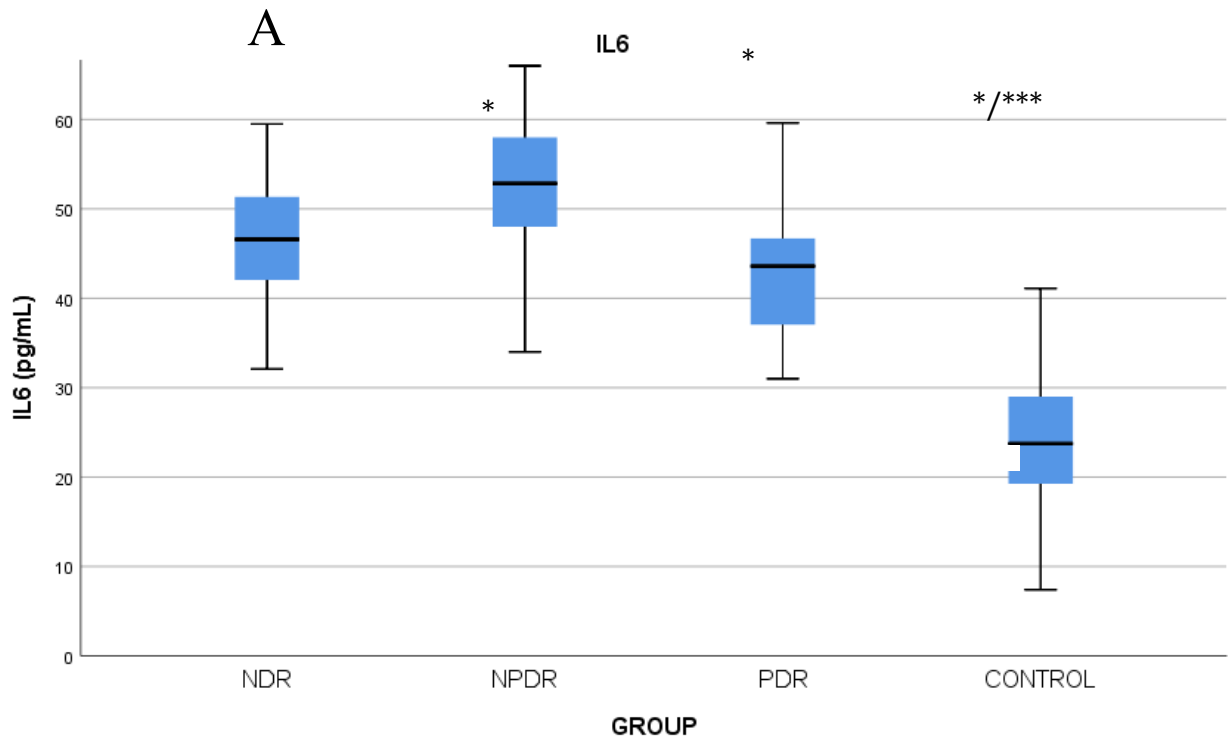
	Rho (spearman ρ)	p Value
Age	0.099	0.44
Time of diagnosis	0.258	0.71
HbA1c	0.687	0.01*
IMC	0.815	0.001*
Serum creatinine	0.801	0.001*
IL-1 β	-0.035	0.76
IL-2	-0.154	0.17
IL-4	-0.254	0.24
IL-6	0.304	0.006*
IL-8	-0.113	0.31
IL-10	-0.012	0.91
IL-12	-0.210	0.06
IL-17 ^a	0.014	0.90
TNF α	0.408	0.001*
IFN γ	-0.133	0.24

Nivel de significancia p<0.05 *.

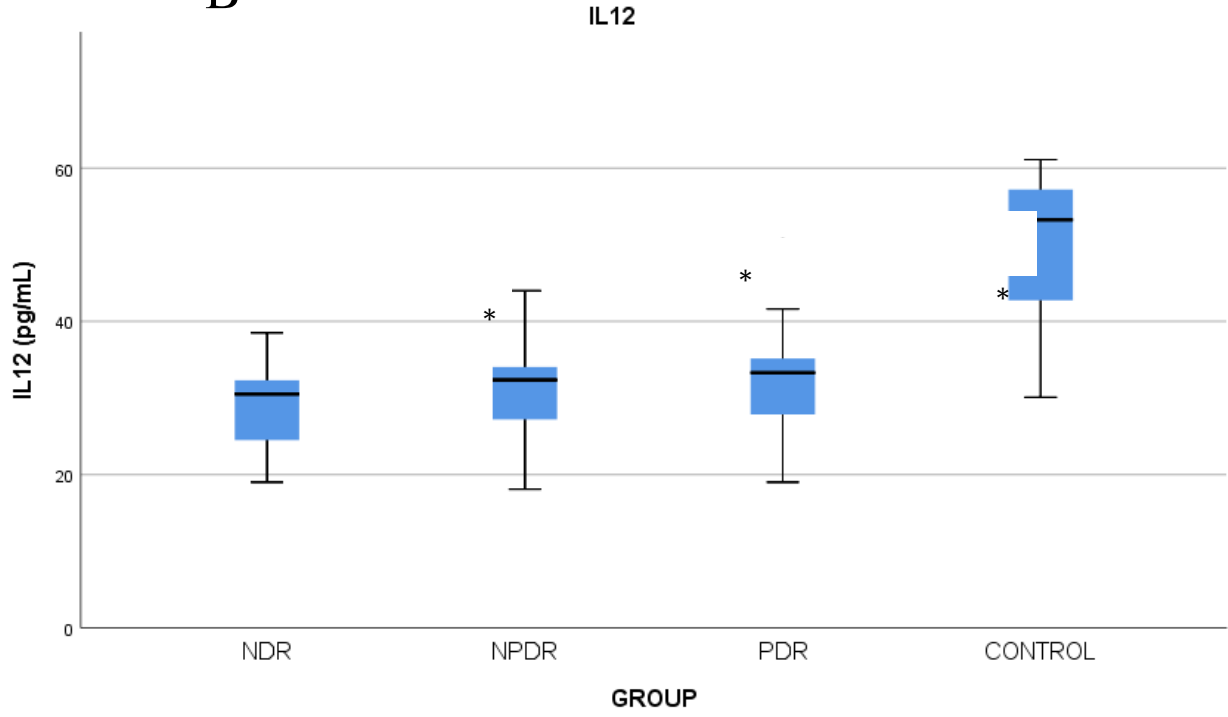
Tabla 5. Regresión lineal múltiple y análisis logístico ordenado por severidad de retinopatía diabética.

Variable	VIF	Modelo 1			Modelo 2			Odds ratio
		Regresión lineal			Regresión logística			
		β	SD	p	β	SD	p	
IL1B	1.48	0.036	0.020		0.441	0.157	**	1.554
IL2	1.56	-0.028	0.020		-0.461	0.163		0.631
IL4	2.47	-0.019	0.019		-0.029	0.071		0.971
IL6	3.77	0.008	0.014	*	-0.045	0.054		0.956
IL8	1.87	-0.010	0.012		-0.062	0.066		0.940
IL10	2.09	-0.043	0.028		-0.156	0.112		0.855
IL12	2.87	0.001	0.015		-0.130	0.076		0.878
IL17	2.82	-0.032	0.013	*	-0.051	0.054		0.951
TNF	2.40	0.152	0.038	**	0.898	0.224	**	2.454
IFN	1.53	0.015	0.054		0.102	0.280		1.107
DX	1.95	0.011	0.017		-0.015	0.080		0.985
HbA1c	3.35	0.408	0.146	**	0.901	0.473		2.462
BMI	3.06	0.215	0.070	**	0.879	0.300	**	2.410
Creatinina	2.98	0.666	0.258	*	3.980	1.595	*	53.527
Adj. R-sq			0.857			0.637		
P>F / P>chi-sq			0.000			0.000		

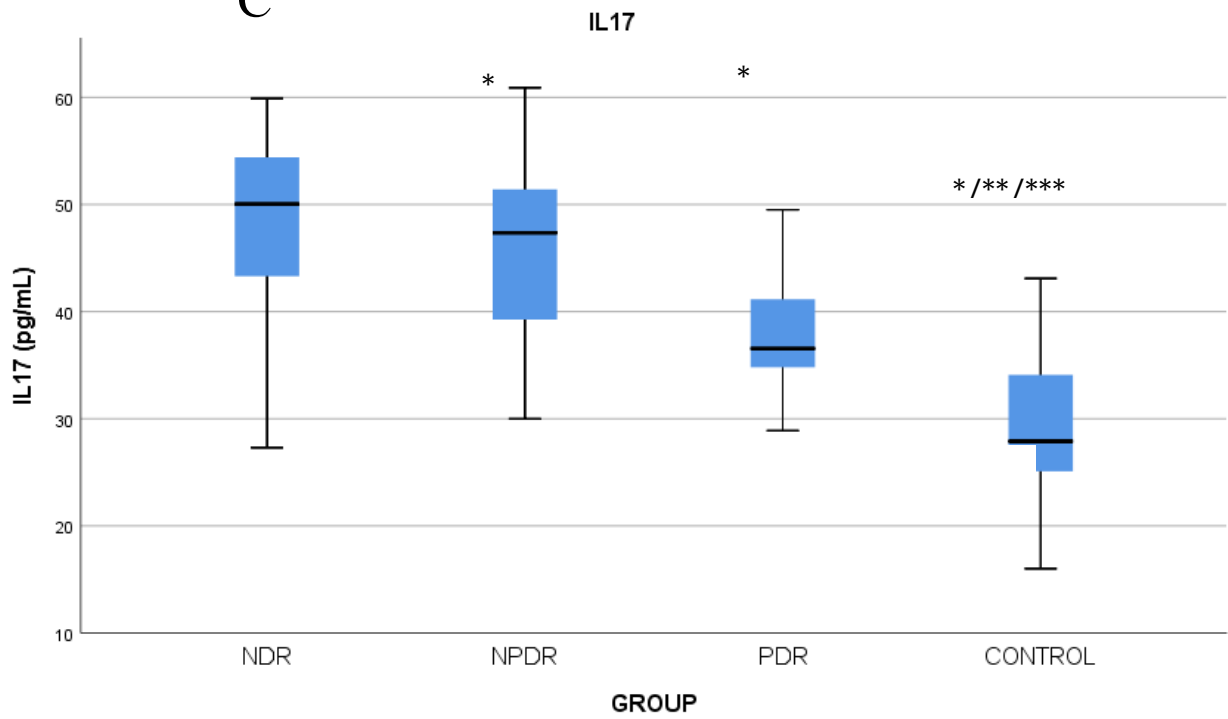
Media VIF = 2.44. Odds ratio= $\exp(\beta)$. P>F usada para la regresión lineal and P>chi-sq para la regresión logística. Valor de P: **p<0.01, *p<0.05



B



C



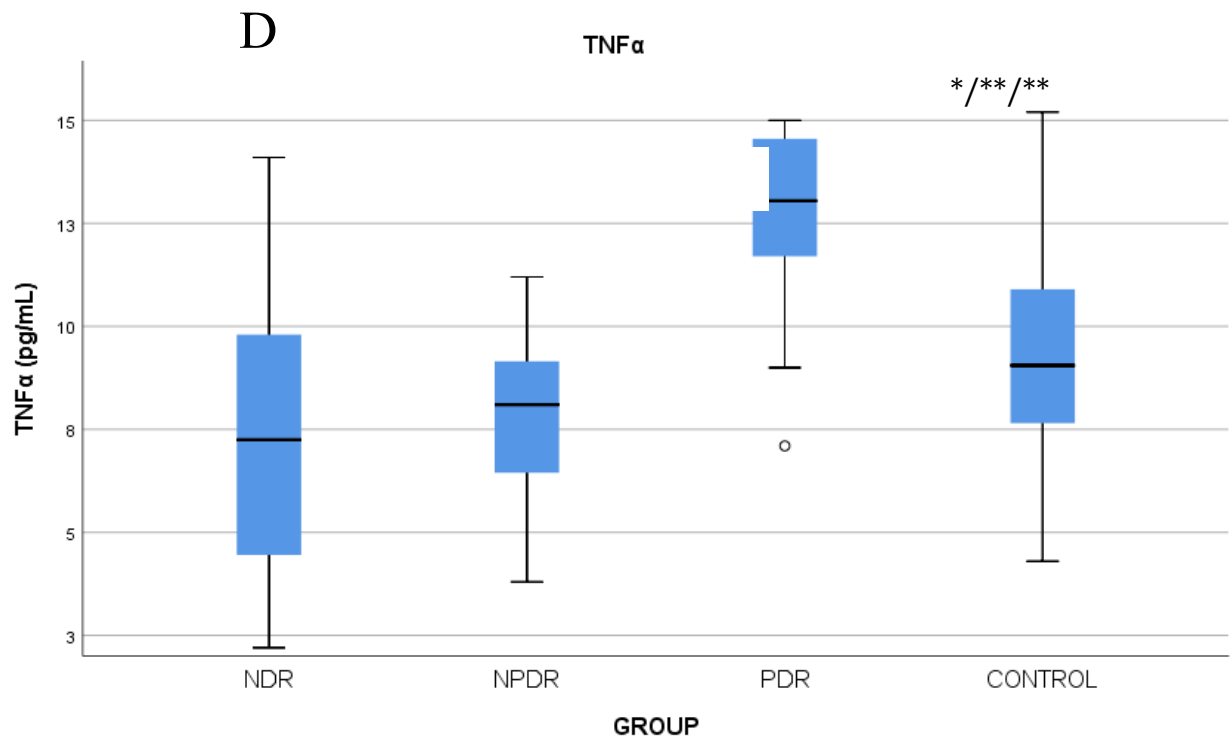


Figure 1. Seric concentration of: A: IL-6, B: IL-12, C: IL-17a and D: TNF α . NDR: Patients without diabetic retinopathy; NPDR: Non proliferative diabetic retinopathy; PDR: Proliferative diabetic retinopathy; * $p < 0.05$ versus CONTROL group; ** $p < 0.05$ versus NDR group; *** $p < 0.05$ versus NPDR.



Instituto de Oftalmología

“Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

Título del protocolo: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LÁGRIMA Y SUERO COMO BIOMARCADORES DE RETINOPATIA EN SUJETOS CON DIABETES TIPO 2.

Investigador principal: **DR. JONATHAN URIEL QUEVEDO MARTÍNEZ**

Nombre del paciente:

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Las proteínas con expresión diferencial presentes en la sangre y lagrime de pacientes con Retinopatía, puede utilizarse como una prueba de laboratorio de identificación de riesgo temprano, diagnóstico y pronóstico de la Retinopatía Diabética que es la causa número uno de ceguera prevenible en el mundo. Esto hará posible la identificación de nuevas terapias para un mejor diseño de medicamentos.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo:

- Determinar las proteínas en lágrima y sangre de sujetos con retinopatía diabética comparada con sujetos sanos.

3. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos, antecedentes médicos y se le tomara una muestra de lágrima y sangre periférica (10mL) por punsión venosa, procedimientos exentos de riesgo, y sus posibles complicaciones son las mismas que las de cualquier extracción de sangre habitual o la instilación de una gota de lagrima artificial para el caso de la extracción de lagrima.

4. MOLESTIAS O RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

El procedimiento puede producir usualmente un poco de dolor e inflamación de la vena, y quedar un pequeño moretón que se resolverá sin tratamiento en las próximas dos semanas.

5. BENEFICIOS QUE PUEDE OBTENER DEL ESTUDIO

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido encontrando mejores y más rápidas formas de diagnosticar la enfermedad previniendo las complicaciones derivadas de la historia natural de la enfermedad cuando el tratamiento es tardío.

6.- ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria

- En el proceso del estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y/o aclaración de cualquier duda acerca de los procedimientos riesgos y beneficios. Si requiere ampliar información sobre su participación en el estudio puede comunicarse al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 54421700 ext. 3212 con la Lic. Edith Romero Chávez
- Si decide participar en el estudio usted puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- El investigador tiene la obligación de proporcionarle información actualizada sobre los avances del estudio.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- No recibirá pago por su participación
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del participante Teléfono	Fecha	No.
---	--------------	------------

Testigo 1

Fecha	Nombre	Firma	Parentesco
--------------	---------------	--------------	-------------------

Domicilio _____

No. Telefónico: _____

Testigo 2

Fecha	Nombre	Firma	Parentesco
--------------	---------------	--------------	-------------------

Domicilio _____

No. Telefónico: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre y firma del investigador Teléfono	Fecha	No.
---	-------	-----

*** Este Consentimiento Informado ha sido aprobado por unanimidad en el Comité de Ética en Investigación de nuestro Instituto, con fundamento en los Artículos 20, 21, 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Jenkins AJ, Joglekar M V., Hardikar AA, Keech AC, O'Neal DN, Januszewski AS. Biomarkers in diabetic retinopathy. *Rev Diabet Stud.* 2015;12(1-2):159-195. doi:10.1900/RDS.2015.12.159
2. Nguyen QM, Srinivasan SR, Xu JH, Berenson GS, Chen W. Correlates of age onset of type 2 diabetes among relatively young black and white adults in a community: The Bogalusa heart study. *Diabetes Care.* 2012;35(6):1341-1346. doi:10.2337/dc11-1818
3. Tizazu AM, Nyunt MSZ, Cexus O, et al. Metformin Monotherapy Downregulates Diabetes-Associated Inflammatory Status and Impacts on Mortality. *Front Physiol.* 2012;35(1-2):1-14. doi:10.1900/RDS.2015.12.159
4. Unger RH, Orci L. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(37):16009-16012. doi:10.1073/pnas.1006639107
5. Philippe M-F, Vadrot D, Larger E, Boitard C, Barbot-Trystram L, Benabadji S. Pancreatic Volume and Endocrine and Exocrine Functions in Patients With Diabetes. *Pancreas.* 2011;40(3):359-363. doi:10.1097/mpa.0b013e3182072032
6. Bacha F, Lee S, Gungor N, Arslanian SA. From pre-diabetes to type 2 diabetes in obese youth: Pathophysiological characteristics along the spectrum of glucose dysregulation. *Diabetes Care.* 2010;33(10):2225-2231. doi:10.2337/dc10-0004
7. Hansen KB, Vilsbøll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):447-453. doi:10.1210/jc.2010-1605
8. Wheeler E, Barroso I. Genome-wide association studies and type 2 diabetes. *Brief Funct Genomics.* 2011;10(2):52-60. doi:10.1093/bfgp/elr008

9. Chiefari E. Functional Variants of the *HMGA1* Gene and Type 2 Diabetes Mellitus. *Jama*. 2011;305(9):903. doi:10.1001/jama.2011.207
10. Friesen M, Cowan CA. Adipocyte Metabolism and Insulin Signaling Perturbations: Insights from Genetics. *Trends Endocrinol Metab*. 2019;xx:1-11. doi:10.1016/j.tem.2019.03.002
11. Gerszten R. Metabolite profiles and diabetes. *Nat Med*. 2011;17(4):448-453. doi:10.1038/nm.2307.Metabolite
12. Testa R, Olivieri F, Sirolla C, et al. Leukocyte telomere length is associated with complications of Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2011;28(11):1388-1394. doi:10.1111/j.1464-5491.2011.03370.x
13. Riaz N, Wolden SL, Gelblum DY, Eric J. HHS Public Access. 2016;118(24):6072-6078. doi:10.1002/cncr.27633.Percutaneous
14. Moran C, Phan TG, Chen J, et al. Brain atrophy in type 2 diabetes: Regional distribution and influence on cognition. *Diabetes Care*. 2013;36(12):4036-4042. doi:10.2337/dc13-0143
15. Wei GS, Coady SA, Goff DC, et al. Blood pressure and the risk of developing diabetes in African Americans and Whites: ARIC, CARDIA, and the Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2011;34(4):873-879. doi:10.2337/dc10-1786
16. Wang J, Luben R, Khaw KT, Bingham S, Wareham NJ, Forouhi NG. Dietary energy density predicts the risk of incident type 2 diabetes the european prospective investigation of cancer (EPIC)-norfolk study. *Diabetes Care*. 2008;31(11):2120-2125. doi:10.2337/dc08-1085
17. Perreault L, Pan Q, Mather KJ, Watson KE, Hamman RF, Kahn SE. Effect of regression from prediabetes to normal glucose regulation on long-term reduction in diabetes risk: Results from the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*. 2012;379(9833):2243-2251. doi:10.1016/S0140-6736(12)60525-X
18. Emerging T, Factors R. Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. 2011.

19. Prado A, Guido M, Camas J. Prevalencia de retinopatía diabética en población mexicana. *Rev Mex Oftalmol*. 2009;83(5):261-266.
20. Thounaojam MC, Powell FL, Patel S, et al. Protective effects of agonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) in early experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(50):13248-13253. doi:10.1073/pnas.1718592114
21. Petropoulos IK, Margetis PI, Antonelou MH, et al. Structural alterations of the erythrocyte membrane proteins in diabetic retinopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245(8):1179-1188. doi:10.1007/s00417-006-0500-6
22. Kaur N, Vanita V. Association of aldose reductase gene (AKR1B1) polymorphism with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016;121:41-48. doi:10.1016/j.diabres.2016.08.019
23. Song Z Du, Tao Y, Han N, Wu YZ. Association of the Aldose Reductase-106TT Genotype with Increased Risk for Diabetic Retinopathy in the Chinese Han Population: An Updated Meta-Analysis. *Curr Eye Res*. 2016;41(8):1087-1091. doi:10.3109/02713683.2015.1084642
24. Cohen SR, Gardner TW. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol*. 2015;55:137-146. doi:10.1159/000438970
25. Li PSH, Wong TH, Tang WWT, Lai JSM. Diabetic retinopathy. *Hong Kong Pract*. 2004;26(8):346-353. doi:10.1016/j.pop.2015.05.005
26. Haines NR, Manoharan N, Olson JL, D'Alessandro A, Reisz JA. Metabolomics Analysis of Human Vitreous in Diabetic Retinopathy and Rhegmatogenous Retinal Detachment. *J Proteome Res*. 2018;17(7):2421-2427. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00169
27. Voigt M, Schmidt S, Lehmann T, et al. Prevalence and Progression Rate of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Patients in Correlation with the Duration of Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018;126(9):570-576. doi:10.1055/s-0043-120570
28. Pesin N, Mandelcorn ED, Felfeli T, Ogilvie RI, Brent MH. The role of occult hypertension in retinal vein occlusions and diabetic retinopathy. *Can J Ophthalmol*. 2017;52(2):225-228. doi:10.1016/j.jcjo.2016.09.009

29. Sabanayagam C, Yip WF, Ting DSW, Tan G, Wong TY. Ten Emerging Trends in the Epidemiology of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmic Epidemiol.* 2016;23(4):209-222. doi:10.1080/09286586.2016.1193618
30. Heng LZ, Comyn O, Peto T, et al. Diabetic retinopathy: Pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabet Med.* 2013;30(6):640-650. doi:10.1111/dme.12089
31. Relhan N, Flynn HW. The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study historical review and relevance to today's management of diabetic macular edema. *Curr Opin Ophthalmol.* 2017;28(3):205-212. doi:10.1097/ICU.0000000000000362
32. Bodnar ZM, Desai A, Akduman L. Diabetic macular edema. *Spectr Domain Opt Coherence Tomogr Macular Dis.* 2016;58:117-127. doi:10.1007/978-81-322-3610-8_8
33. Massin P, Tichet J, Vol S, Erginay A, Cailleau M, Balkau B. Hemoglobin A. 2015;129(2):188-195.
34. Shroff D, Gupta P, Gupta C, Shroff C. 'Dye-less' angiography of diabetic retinal neovascularisation. *Postgrad Med J.* 2019;0(0):postgradmedj-2019-136560. doi:10.1136/postgradmedj-2019-136560
35. Hwang TS, Jia Y, Gao SS, et al. Optical Coherence Tomography Angiography Features of Diabetic Retinopathy. *Retina.* 2015;35(11):2371-2376. doi:10.1097/IAE.0000000000000716
36. Frank R. Diabetic retinopathy and systemic factors. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2015;22(2):151. doi:10.4103/0974-9233.154388
37. Nikkhah H, Ghazi H, Razzaghi MR, Karimi S, Ramezani A, Soheilian M. Extended targeted retinal photocoagulation versus conventional pan-retinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy in a randomized clinical trial. *Int Ophthalmol.* 2018;38(1):313-321. doi:10.1007/s10792-017-0469-7
38. Brănișteanu DC, Bilha A, Moraru A. Vitrectomy surgery of diabetic retinopathy complications. *Rom J Ophthalmol.* 2016;60(1):31-36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27220230><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5712917>.

39. Hsieh M-C, Yeh P-T, Yang C-M, Yang C-H. Anterior Retinal Cryotherapy and Intravitreal Injection of Bevacizumab in the Treatment of Nonclearing Vitreous Hemorrhage in Proliferative Diabetic Retinopathy. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013;30(4):353-358. doi:10.1089/jop.2013.0104
40. Lamoureux EL, Tai ES, Thumboo J, et al. Impact of Diabetic Retinopathy on Vision-Specific Function. *Ophthalmology.* 2010;117(4):757-765. doi:10.1016/j.ophtha.2009.09.035
41. Care D, Suppl SS. Microvascular complications and foot care: Standards of medical care in Diabetesd2018. *Diabetes Care.* 2018;41(January):S105-S118. doi:10.2337/dc18-S010
42. Frantzi M, Bhat A, Latosinska A. Clinical proteomic biomarkers: relevant issues on study design & technical considerations in biomarker development. *Clin Transl Med.* 2014;3(1):7. doi:10.1186/2001-1326-3-7
43. Rutledge TF, Boyd MF. Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance of Screening-Detected Cancers (Colon and Rectum , Breast , and Cervix) — United States , 2004 – 2006. *Prevention.* 2010;59:2004-2006.
44. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol.* 2006;24(8):971-983. doi:10.1038/nbt1235
45. Liu D, Zhou XH. Covariate Adjustment in Estimating the Area Under ROC Curve with Partially Missing Gold Standard. *Biometrics.* 2013;69(1):91-100. doi:10.1111/biom.12001
46. Pavlou MP, Diamandis EP, Blasutig IM. The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic. *Clin Chem.* 2013;59(1):147-157. doi:10.1373/clinchem.2012.184614
47. Tabb DL. Quality assessment for clinical proteomics. *Clin Biochem.* 2013;46(6):411-420. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.12.003
48. Lescuyer P, Hochstrasser D, Rabilloud T, Lescuyer P, Hochstrasser D, Rabilloud T. How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery ? To cite this version : HAL Id : hal-00293980. *J Proteome Res.* 2008:3371-3376.

49. Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, et al. Body fluid proteomics for biomarker discovery: Lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res.* 2007;6(12):4549-4555. doi:10.1021/pr070529w
50. Mischak H, Vlahou A, Ioannidis JPA. Technical aspects and inter-laboratory variability in native peptide profiling: The CE-MS experience. *Clin Biochem.* 2013;46(6):432-443. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.09.025
51. Skates SJ, Gillette MA, LaBaer J, et al. *Statistical Design for Biospecimen Cohort Size in Proteomics-Based Biomarker Discovery and Verification Studies.* Vol 12.; 2013. doi:10.1021/pr400132j
52. Berg JM, Tabb DL, Tymoczko JL, et al. Repeatability and Reproducibility in Proteomic Identifications by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 2010;9(2):761-776. doi:10.1021/pr9006365.Repeatability
53. White NMA, Masui O, DeSouza L V., et al. Quantitative proteomic analysis reveals potential diagnostic markers and pathways involved in pathogenesis of renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(2). doi:10.18632/oncotarget.1529
54. Mischak H, Allmaier G, Apweiler R, et al. Mischak2010. 2010.
55. Makridakis M, Vlahou A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *J Proteomics.* 2010;73(12):2291-2305. doi:10.1016/j.jprot.2010.07.001
56. Albrethsen J, Knol JC, Piersma SR, et al. Subnuclear Proteomics in Colorectal Cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9(5):988-1005. doi:10.1074/mcp.m900546-mcp200
57. Polaskova V, Kapur A, Khan A, Molloy MP, Baker MS. High-abundance protein depletion: Comparison of methods for human plasma biomarker discovery. *Electrophoresis.* 2010;31(3):471-482. doi:10.1002/elps.200900286
58. Pham T V., Piersma SR, Oudgenoeg G, Jimenez CR. Label-free mass spectrometry-based proteomics for biomarker discovery and validation. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012;12(4):343-359. doi:10.1586/erm.12.31
59. O. S, M.J. T. Affinity proteomics: The role of specific binding reagents in human proteome analysis. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9(4):401-414. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=2012545569>.

60. Mayer P, Mayer B, Mayer G. Systems biology building a useful model from multiple markers and profiles. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(11):3995-4002. doi:10.1093/ndt/gfs489
61. Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. A Proposed Definition and Overview of the Field. *Methods Inf Med*. 2001;40(4):346-358.
62. Zhang F, Drabier R. IPAD: the Integrated Pathway Analysis Database for Systematic Enrichment Analysis. *BMC Bioinformatics*. 2012;13 Suppl 1(Suppl 15):S7. doi:10.1186/1471-2105-13-S15-S7
63. Hajjan-Tilaki K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Casp J Intern Med*. 2013;4(2):627-635.
64. Fleshner K, Carlsson SV RM. prostate cancer incidence patterns in the USA. *Nat Rev Urol* 2. 2017;14(1):26-37. doi:10.1038/nrurol.2016.251.The
65. Ndoja S, Lima H. Monoclonal Antibodies. *Curr Dev Biotechnol Bioeng Hum Anim Heal Appl*. 2016;1131:71-95. doi:10.1016/B978-0-444-63660-7.00004-8
66. Tekin HC, Gijs MAM. Ultrasensitive protein detection: A case for microfluidic magnetic bead-based assays. *Lab Chip*. 2013;13(24):4711-4739. doi:10.1039/c3lc50477h
67. Ting DSW, Tan KA, Phua V, Tan GSW, Wong CW, Wong TY. Biomarkers of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2016;16(12). doi:10.1007/s11892-016-0812-9
68. Song J, Chen S, Liu X, Duan H, Kong J, Li Z. Relationship between C-reactive protein level and diabetic retinopathy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(12):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0144406
69. Xu C, Wu Y, Liu G, Liu X, Wang F, Yu J. Relationship between homocysteine level and diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. *Diagn Pathol*. 2014;9:167. doi:10.1186/s13000-014-0167-y
70. Van Hecke M V., Dekker JM, Nijpels G, et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: The Hoorn Study. *Diabetologia*. 2005;48(7):1300-1306. doi:10.1007/s00125-005-1799-y
71. Boehm BO, Schilling S, Rosinger S, et al. Elevated serum levels of NE-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with

proliferative diabetic retinopathy and macular oedema. *Diabetologia*. 2004;47(8):1376-1379. doi:10.1007/s00125-004-1455-y

72. Gopalakrishnan V, Purushothaman P, Bhaskar A. Proteomic analysis of plasma proteins in diabetic retinopathy patients by two dimensional electrophoresis and MALDI-Tof-MS. *J Diabetes Complications*. 2015;29(7):928-936. doi:10.1016/j.jdiacomp.2015.05.021

73. Lu CH, Lin ST, Chou HC, Lee YR, Chan HL. Proteomic analysis of retinopathy-related plasma biomarkers in diabetic patients. *Arch Biochem Biophys*. 2013;529(2):146-156. doi:10.1016/j.abb.2012.11.004

74. Liu Y-P, Lu X-H, Hu S-W, Wu Z-F, Mei L-X, Lang P. Proteomic analysis of human serum from diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 2011;4(6):616-622. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2011.06.08

75. Mitchell P, Wong TY, Choi H, et al. Plasma Metabonomic Profiling of Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 2016;65(4):1099-1108. doi:10.2337/db15-0661

76. Xia JF, Wang Z hua, Liang QL, Wang YM, Li P, Luo GA. Correlations of six related pyrimidine metabolites and diabetic retinopathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta*. 2011;412(11-12):940-945. doi:10.1016/j.cca.2011.01.025

77. Li J-K, Wei F, Jin X-H, Dai Y-M, Cui H-S, Li Y-M. Changes in vitreous VEGF, bFGF and fibrosis in proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab. *Int J Ophthalmol*. 2015;8(6):1202-1206. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2015.06.22

78. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular Endothelial Growth Factor Induces Rapid Phosphorylation of Tight Junction Proteins Occludin and Zonula Occluden 1. *J Biol Chem*. 2002;274(33):23463-23467. doi:10.1074/jbc.274.33.23463

79. Zymek P, Bujak M, Chatila K, et al. The Role of Platelet-Derived Growth Factor Signaling in Healing Myocardial Infarcts. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2315-2323. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.060

80. Castellon R, Hamdi HK, Sacerio I, Aoki AM, Cristina Kenney M, Ljubimov A V. Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2002;74(4):523-535. doi:10.1006/exer.2001.1161

81. Yokota T, Ma RC, Park J, et al. Role of Protein Kinase C on the Expression of Platelet-Derived Growth Factor and Endothelin-1 in the. *Diabetes*. 2003;52(March):637-640. doi:10.2337/diabetes.52.3.838
82. Eichler W, Yafai Y, Kuhrt H, et al. Hypoxia: Modulation of endothelial cell proliferation by soluble factors released by retinal cells. *Neuroreport*. 2001;12(18):4103-4108. doi:10.1097/00001756-200112210-00048
83. Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 20;19(6):1816.
84. Raczyńska D, Lisowska KA, Pietruczuk K, Borucka J, Ślizień M, Raczyńska K, Glasner L, Witkowski JM. The Level of Cytokines in the Vitreous Body of Severe Proliferative Diabetic Retinopathy Patients Undergoing Posterior Vitrectomy. *Curr Pharm Des*. 2018;24(27):3276-3281.
85. Zeng Y, Cao D, Yu H, Hu Y, He M, Yang D, Zhuang X, Zhang L. Comprehensive analysis of vitreous humor chemokines in type 2 diabetic patients with and without diabetic retinopathy. *Acta Diabetol*. 2019 Jul;56(7):797-805.
86. Wu F, Phone A, Lamy R, Ma D, Laotaweerungsawat S, Chen Y, Zhao T, Ma W, Zhang F, Psaras C, Stewart JM. Correlation of Aqueous, Vitreous, and Plasma Cytokine Levels in Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020 Feb 7;61(2):26.
87. Sun C, Zhang H, Jiang J, Li Y, Nie C, Gu J, Luo L, Wang Z. Angiogenic and inflammatory biomarker levels in aqueous humor and vitreous of neovascular glaucoma and proliferative diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol*. 2020 Feb;40(2):467-475.
88. Xie, A. Hu, Y. Luo, W. Sun, X. Hu, and S. Tang, "Interleukin-4 and melatonin ameliorate high glucose and interleukin-1beta stimulated inflammatory reaction in human retinal endothelial cells and retinal pigment epithelial cells," *Molecular Vision*, vol. 20, no. 6, pp. 921–928, 2014.
89. Chen, R., Lowe, L., Wilson, J.D., Crowther, E., Tzeggai, K., Bishop, J.E., and Varro, R. (1999) Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem* 45, 1693–1694. 3.

90. Tárnok, A., Hamsch, J., Chen, R., and Varro, R. (2003) Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clin Chem* 49, 1000–1002. 4.
91. Earley, M.C., Vogt, R.F., Shapiro, H.M., Mandy, F.F., Kellar, K.L., Bellisario, R., Pass, K.A., Marti, G.E., Stewart, C.C., and Hannon, W.H. (2002) Report from a workshop on multianalyte microsphere assays. *Cytometry* 50, 239–242. 5.
92. Bai R, Tao L, Li B, Liu A, Dai X, Ji Z, Jian M, Ding Z, Luo L, Chen T, Ma M, Peng Y, Bao F. Using cytometric bead arrays to detect cytokines in the serum of patients with different types of pulmonary tuberculosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2019 Jan-Dec.
93. Bai R, Tao L, Li B, Liu A, Dai X, Ji Z, Jian M, Ding Z, Luo L, Chen T, Ma M, Peng Y, Bao F. Using cytometric bead arrays to detect cytokines in the serum of patients with different types of pulmonary tuberculosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2019 Jan-Dec.
94. Moncunill G, Campo JJ, Dobaño C. Quantification of multiple cytokines and chemokines using cytometric bead arrays. *Methods Mol Biol*. 2014;1172:65-86.
95. Lund-Johansen, F., Davis, K., Bishop, J., and de Waal Malefyt, R. (2000) Flow cytometric analysis of immunoprecipitates: high-throughput analysis of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cytometry* 39, 250–9.
96. MacCallum, D.M., Castillo, L., Brown, A.J., Gow, N.A., and Odds, F.C. (2009) Early expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infections. *PLoS One* 4, e6420.
97. Apolipoprotein A-I concentration in tears in diabetic retinopathy. *Ann Clin Biochem*. 2002;39(1):56-61. doi:10.1258/0004563021901748
98. Zhao Z, Liu J, Shi B, He S, Yao X, Willcox MDP. Advanced glycation end product (AGE) modified proteins in tears of diabetic patients. *Mol Vis*. 2010;16(July):1576-1584.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20806041>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2927418>.

99. Yu L, Chen X, Qin G, Xie H, Lv P. Tear film function in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Ophthalmologica*. 2008;222(4):284-291. doi:10.1159/000140256
100. Zhou L, Beuerman RW, Foo Y, Liu S, Ang LPK, Tan DTH. Characterisation of human tear proteins using high-resolution mass spectrometry. *Ann Acad Med Singapore*. 2006;35(6):400-407.
101. Kim HJ, Kim PK, Yoo HS, Kim CW. Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients. *Clin Biochem*. 2012;45(1-2):60-67. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.10.006
102. Manolio T. Novel Risk Markers and Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1587-1589. doi:10.1056/nejmp038136
103. Gul Malik T, Shoaib Ahmed S, Gul R, Ayesha E. Comparative Analysis Of Serum Proangiogenic Biomarkers Between Those With And Without Diabetic Retinopathy. *J Coll Physicians Surg Pakistan*. 2018;28(9):686-689. doi:10.29271/jcpsp.2018.09.686
104. Ted Chun Tat Fong. Indirect Effects of Body Mass Index Growth on Glucose Dysregulation via Inflammation: Causal Moderated Mediation Analysis. *Obes Facts*. 2019;12(3):316-327.
105. J. Tang and T. S. Kern, "Inflammation in diabetic retinopathy," *Progress in Retinal and eye Research*, 2011 vol. 30, no. 5, pp. 343– 358.
106. H. Hang, S. Yuan, Q. Yang, D. Yuan, and Q. Liu, "Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy," *Molecular Vision*, vol. 20, no. 4, pp. 1137–1145, 2014.
107. Weinstein JE, Pepple KL. Cytokines in uveitis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2018 May;29(3):267-274.
108. Schmitt N, Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr Opin Immunol*. 2015 Jun; 34:130-6
109. Hui Hang 1, Songtao Yuan 1, Qin Yang 1, Dongqing Yuan 1, Qinghuai Liu 1 Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2014 Aug 4;20:1137-45. eCollection 2014

110. Desislava N Koleva-Georgieva 1, Nelly P Sivkova, Dora Terzieva, Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy, *Folia Med (Plovdiv)* Apr-Jun 2011;53(2):44-50
111. S Mirza 1, Monir Hossain, Christine Mathews, Perla Martinez, Paula Pino, Jennifer L Gay, Anne Rentfro, Joseph B McCormick, Susan P Fisher-Hoch Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study. *Cytokine* 2012 Jan;57(1):136-42.
112. Chui Ming Gemmy Cheung 1, Maya Vania, Marcus Ang, Soon Phaik Chee, Jing Li Comparison of aqueous humor cytokine and chemokine levels in diabetic patients with and without retinopathy. *Mol Vis.* 2012;18:830-7
113. Chen H, Wen F, Zhang X, Su SB. Expression of T-helper-associated cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with retinopathy. *Mol Vis* 2012; 18:219-26.
114. Lange CA, Stavrakas P, Luhmann UF, de Silva DJ, Ali RR, Gregor ZJ, Bainbridge JW. Intraocular oxygen distribution in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2011
115. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q et al. Cutting edge: increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol* 2010; 185: 3814–3818
116. Ao-Wang Qiu,1 Zheng Bian,1 Ping-An Mao,1 and Qing-Huai Liu IL-17A exacerbates diabetic retinopathy by impairing Müller cell function via Act1 signaling *Exp Mol Med.* 2016 Dec; 48(12): e280.
117. Afzal Nadeem 1, Khursheed Javaid 2, Waqas Sami 3, Abu Zafar 4, Shah Jahan 2, Shakeela Zaman 5, Ah Nagi 6 Inverse relationship of serum IL-17 with type-II diabetes retinopathy *Clin Lab.* 2013;59(11-12):1311-7.
118. Ali M, Mali V, Haddox S, AbdelGhany SM, El-Deek SEM, Abulfadl A, Matrougui K, Belmadani S. Essential Role of IL-12 in Angiogenesis in Type 2 Diabetes. *Am J Pathol.* 2017 Nov;187(11):2590-2601.
119. Boss, J.D.; Singh, P.K.; Pandya, H.K.; Tosi, J.; Kim, C.; Tewari, A.; Juzych, M.S.; Abrams, G.W.; Kumar, A. Assessment of neurotrophins and inflammatory

mediators in vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017, 58, 5594–5603.

120. Wu, H.; Hwang, D.K.; Song, X.; Tao, Y. Association between aqueous cytokines and diabetic retinopathy stage. *J. Ophthalmol.* 2017, 2017, 9402198.

121. Mesquida M, Drawnel F, Fauser S. The role of inflammation in diabetic eye disease. *Semin Immunopathol.* 2019 Jul;41(4):427-445.

122. Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as biomarkers of diabetic retinopathy and disease progression. *Neural Regen Res.* 2019 Nov;14(11):1858-1869.

123. Andreasson R, Ekelund C, Landin-Olsson M, Nilsson C. HbA1c levels in children with type 1 diabetes and correlation to diabetic retinopathy. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018 Mar 28;31(4):369-374.

124. Hermann JM, Hammes HP, Rami-Merhar B, Rosenbauer J, Schütt M, et al. HbA1c variability as an independent risk factor for diabetic retinopathy in type 1 diabetes: a German/ Austrian multicenter analysis on 35,891 patients. *PLoS One* 2014;9

125. Zhang X, Kumari N, Low S, Ang K, Yeo D, Yeoh LY, Liu A, Kwan PY, Tang WE, Tavintharan S, Sum CF, Lim SC. The association of serum creatinine and estimated glomerular filtration rate variability with diabetic retinopathy in Asians with type 2 diabetes: A nested case-control study. *Diab Vasc Dis Res.* 2018 Nov;15(6):548-558.

126. Li XQ, Zheng X, Chen M, Zhao MH. Characteristics of diabetic nephropathy patients without diabetic retinopathy: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore).* 2017 May;96(18):e6805.