



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA
CEGUERA EN MÉXICO**

**DETERMINACIÓN DE ISOFORMAS DE VEGF EN
VÍTREO DE PACIENTES CON RETINOPATÍA
DIABÉTICA PROLIFERATIVA EN POBLACIÓN
MEXICANA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL:

TÍTULO DE ESPECIALIDAD

EN:

OFTALMOLOGÍA

PRESENTA:

BENJAMÍN ABOYTES RÍOS

TUTOR:

DR. LENIN DAVID OCHOA DE LA PAZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO,
SEPTIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos de identificación

INSTITUCIÓN:

Asociación Para Evitar La Ceguera en México, I.A.P.

Hospital "Dr. Luis Sánchez Bulnes"

TUTOR:

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Investigador de la Unidad de Investigación UNAM-APEC de la Asociación para Evitar la Ceguera en México. I.A.P.

Correo electrónico: lochoa@unam.com.mx

ASPIRANTE A TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN OFTALMOLOGÍA:

Dr. Benjamín Aboytes Ríos

Médico residente de tercer año de oftalmología de la Asociación para Evitar la Ceguera en México. I.A.P.

Correo electrónico: benaborivers@gmail.com

Sitio: Unidad de Investigación UNAM-APEC

Área de estudio: Retina y vítreo.

Perfil de la investigación: Epidemiológico.

Índice

<u>Datos de identificación.....</u>	<u>3</u>
<u>Antecedentes.....</u>	<u>4</u>
<u>Justificación.....</u>	<u>7</u>
<u>Planteamiento del problema.....</u>	<u>7</u>
<u>Objetivos.....</u>	<u>7</u>
<u>Hipótesis.....</u>	<u>8</u>
<u>Diseño del estudio.....</u>	<u>8</u>
<u>Metodología.....</u>	<u>8</u>
<u>Aspectos éticos.....</u>	<u>19</u>
<u>Resultados.....</u>	<u>19</u>
<u>Discusión.....</u>	<u>26</u>
<u>Conclusiones.....</u>	<u>29</u>
<u>Referencias.....</u>	<u>31</u>

Antecedentes

El proceso de angiogénesis es la formación de nuevos vasos a partir de preexistentes y que facilitan el aporte de oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento a las células, así como la remoción de productos de deshecho. En los organismos adultos, la angiogénesis es necesaria en eventos de reparación de tejido dañados por acción mecánica como el que se presenta en heridas.¹

El factor de crecimiento endotelial (VEGF) es uno de los más cruciales y específicos reguladores de la angiogénesis. El VEGF involucra a una familia de glicoproteínas que se dividen en VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento placentario y VEGF-F. Sus respectivos receptores están acoplados a cinasas de tirosina que, al activarse por su respectivo ligando extracelular, sufren una dimerización y autofosforilación que activan una cascada de señalización por segundos mensajeros ². El VEGF promueve la permeabilidad vascular y angiogénesis, juega un rol importante durante la embriogénesis. Las situaciones de hipoxia e isquemia aumentan significativamente los niveles de VEGF en diferentes tejidos incluyendo el ojo, en donde prácticamente está ausente en la etapa adulta.^{3,4} El VEGF- A al ser el principal mediador de la angiogénesis, estimula la fuga vascular y la proliferación celular vascular endotelial ⁵, sin embargo, no se sabe cuál es la participación de otras isoformas de VEGF, como la VEGF-B y la VEGF-C asociadas procesos anti-vasculares e inflamatorios respectivamente, y que en angiopatías oculares como la retinopatía diabética proliferativa (RDP) forman parte del proceso degenerativo.

La retinopatía diabética (RD) es la causa de discapacidad visual con mayor prevalencia en la población trabajadora en países desarrollados a pesar de los programas de prevención, diagnóstico oportuno y tratamiento. A nivel mundial hay aproximadamente 93 millones de personas con retinopatía diabética, de estos previos, 17 millones con retinopatía diabética proliferativa. ¹

La retina es uno de los tejidos con mayor demanda metabólica y de oxígeno, , por lo que, es susceptible a cualquier cambio en la aportación de nutrientes y oxígeno.² En términos generales, las condiciones de hiperglicemia que se presentan durante la retinopatía diabética generan alteraciones metabólicas, incremento de las vías de los polioles y de la hexosamina, síntesis de novo de diacilglycerol, producción de radicales libres, productos de glucosilación avanzada, y estrés reticular^{6,7}. La cronopatología de la RD se divide en cuatro fases:

- 1- **Daño retiniano sin anomalías microvasculares visibles:** se caracteriza por alteraciones metabólicas en respuesta a la hiperglicemia que conllevan a una discapacidad microvascular temprana y neurovascular, además de condiciones de neurodegenerativas debido a la liberación de glutamato al medio extracelular. Este

proceso de excitotoxicidad, sumado a la pérdida de factores neuroprotectores como el PEDF, somatostatina y neurotrofinas generan una sobreexpresión de VEGF^{8,9}. Por otro lado, algunos trabajos señalan que la eritropoyetina, un factor neuroprotector, incrementa su concentración en el vítreo de pacientes con diabetes, por lo que probablemente este potenciando el efecto angiogénico del VEGF¹⁰.

- 2- **Retinopatía diabética no proliferativa leve-moderada:** durante esta fase, se presentan cambios microvasculares, edema macular, y se generan microaneurismas y microhemorragias en punto debido a un engrosamiento de la membrana basal, pérdida de pericitos y daño endotelial¹¹. Este cambio en la membrana basal incrementa su permeabilidad a componentes de contenido intravascular como VEGF, ácido palmítico e interleucinas al espacio intersticial. Por otro lado, es importante mencionar que el VEGF y algunas citocinas también son generadas por células gliales, que debido a las condiciones de excitotoxicidad, participan de manera importante en el desbalance microvascular temprano y en la ruptura de la barrera hemato-retiniana¹⁰.
- 3- **Retinopatía diabética no proliferativa severa:** en este estadio existen cambios avanzados, pre-proliferativos, se presenta una vasoconstricción debido a un daño endotelial y por consiguiente un ambiente hipóxico debido al desbalance en la liberación de factores vasoactivos sintetizados por el endotelio. En la clínica, las “manchas algodinosas” son lesiones secundarias a la estasis del flujo axoplásmico que, en RD, indica zonas de isquemia.
- 4- **Retinopatía diabética proliferativa:** es el estadio final del proceso degenerativo, donde la hipoxia severa es el factor principal, que lleva a un desbalance entre mediadores angiogénicos y anti-angiogénicos, favoreciendo la neovascularización. Se presenta un proceso proteolítico generalizado, principalmente en la membrana basal en donde proteasas de leucocitos juegan un factor esencial. Los fragmentos proteolíticos y los factores angiogénicos, en especial VEGF, llevan a la migración y replicación de células endoteliales y, en consecuencia, nuevos vasos sanguíneos. Estos nuevos vasos son frágiles, debilitando la arquitectura retiniana y facilitando al sangrado y crecimiento dentro del vítreo. Posteriormente provoca la formación de tejido fibrótico que al contraerse causa desprendimientos de retina traccionales.¹²

Considerando las diferentes etapas en la evolución de la RD, un factor causal presente desde el inicio del daño a nivel ocular es el incremento de VEGF. Este aumento se da como consecuencia de un proceso neurodegenerativo asociado a un desbalance temprano microvascular presente en las condiciones de isquemia retiniana, que se presentan en diferentes retinopatías, incluyendo la retinopatía diabética proliferativa.¹³ Sin embargo,

aparentemente el incremento de VEGF no solo se genera en la retina neural, por ejemplo, Kovak y colaboradores (2015) observaron un aumento significativo en los niveles de VEGF en vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa¹⁴. Por otro lado, algunos estudios muestran que posterior a una vitrectomía los niveles de VEGF-A en vítreo se asemejan a los de personas sin retinopatía diabética proliferativa¹⁵. En desprendimientos de retina serosos, se ha demostrado un aumento en los niveles de VEGF-A¹⁶. De la misma forma, en el caso de desprendimientos de retina traccionales se ha demostrado un aumento significativo de este factor de crecimiento vascular¹⁷. Sin embargo, hasta el momento no hay estudios que hayan demostrado la presencia de las isoformas VEGF-B y VEGF-C en vítreo en angiopatías oculares.

VEGF-B se une a los receptores VEGFR1 y NP1, pero a diferencia del VEGF-A que se une a los mismos tipos de receptores, no induce la neovascularización y la permeabilidad vascular.¹⁸ VEGF-B es un factor neuroprotector y un inhibidor de la apoptosis en diferentes tipos de células neuronales. Se ha determinado su expresión en el sistema nervioso central, incluyendo retina y sistema nervioso periférico. Sin embargo, se desconoce cuál es su participación en condiciones hiperglucémicas¹⁹. Algunos trabajos sugieren la presencia de VEGF-B en pacientes diabéticos, y un incremento en su concentración en pacientes con un estadio proliferativo de la retinopatía diabética¹⁸. En modelos animales se ha observado una sobreexpresión de VEGF-B en condiciones hiperglucémicas, y además, una inhibición de la apoptosis retiniana. Estudios in vitro han mostrado que el tratamiento con VEGF-B no causa una actividad angiogénica significativa²⁰, al contrario, inhibe de la neovascularización coroidea y retinal, debido a la activación de sus receptores VEGFR-1 y NPR-1.²¹ Por lo tanto, a diferencia del VEGF-A, VEGF-B aparentemente tiene un efecto protector en la retina, por lo que podría ser un blanco farmacológico como tratamiento en la degeneración retiniana en diferentes enfermedades oculares como la retinopatía diabética.¹⁹

VEGF-C es una isoforma de VEGF con una estructura similar al VEGF-A que estimula la proliferación y migración de células endoteliales, promueve la liberación de óxido nítrico y activa el plasminógeno. Inicialmente se creía que sólo era inductor de la linfagiogénesis²², sin embargo, en ratones se ha observado que el VEGF-C induce la angiogénesis y aumenta la permeabilidad vascular. VEGF-C es un ligando para VEGFR-2 y VEGFR-3 y recientemente se ha identificado en el endotelio de la coriocapilaris²³. El incremento en la concentración de VEGF-A y/o glucosa inducen una sobre regulación de la expresión de VEGF-C, incrementando su concentración, sin embargo, hay poca información respecto a esta isoforma y su implicación en la retinopatía diabética.

Justificación

La retinopatía diabética proliferativa, es una de las principales complicaciones secundarias a una diabetes de larga evolución. Siendo esta condición propiciada por un proceso angiogénico patológico caracterizado por un incremento de VEGF-A en vítreo de personas con este padecimiento. Sin embargo, la información respecto a presencia y participación de otras isoformas (VEGF-B y VEGF-C) es muy escasa en pacientes con retinopatía diabética proliferativa. Caracterizar la presencia de VEGF-B y VEGF-C, permitirán establecer una posible correlación entre la presencia de algunas de estas isoformas con el avance en la RDP, permitiendo desarrollar alguna estrategia de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad en pacientes con RD inicial. De esta forma este proyecto establecería estrategias farmacológicas más precisas para su tratamiento.

Planteamiento del problema

¿Existe una correlación entre la presencia y la concentración de VEGF-B y VEGF-C en vítreo de pacientes con la retinopatía diabética proliferativa?

Objetivos

Primario:

- Determinar la presencia y concentración de diferentes isoformas de VEGF en vítreo de pacientes vitrectomizados con retinopatía diabética proliferativa en la Asociación para Evitar la Ceguera en México I. A. P.

Secundarios: (exploratorios)

- Determinar por la técnica de BCA la presencia y concentración de proteínas en las muestras procesadas de vítreo de pacientes vitrectomizados por RDP y en pacientes vitrectomizados por causas que no involucren un proceso de angiogénesis.
- Establecer por ensayos de ELISA la concentración de las isoformas VEGF-A, VEGF-B y VEGF-C en vítreo de pacientes vitrectomizados por RDP y en pacientes vitrectomizados por causas que no involucren un proceso de angiogénesis.

Hipótesis

Primaria:

Los niveles de VEGF en sus isoformas A, B y C, se encuentran aumentados en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa.

Secundarias:

- La concentración de las diferentes isoformas de VEGF –A, B y -C, están aumentadas en el vítreo de pacientes retinopatía diabética.
- La concentración de las diferentes isoformas de VEGF –A, B y -C, no se modifica en el vítreo de pacientes con patologías no angiogénicas.

Diseño del estudio

- De acuerdo con el momento en que se capta la información: prospectivo.
- De acuerdo con el número de veces en que se mide o determina la variable de interés principal: transversal
- De acuerdo con la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza: Observacional.
- De acuerdo con el análisis de la población de estudio: Comparativo.

Metodología

Lugar: Unidad de Investigación UNAM-APEC, Asociación para evitar la Ceguera, “Hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes”.

Universo: Trabajadores de la salud de APEC.

Obtención de la Población: Se invita a pacientes que vayan a ser sometidos a cirugía de vitrectomía dentro de la institución a participar en el protocolo.

Unidad de observación: Sujeto.

Método de muestreo: Reclutamiento consecutivo.

Grupo control

- Pacientes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes sometidos a vitrectomía por desprendimiento de retina regmatógeno.
- Pacientes sin antecedentes de cirugías oftalmológicas.

Grupo de estudio

- Pacientes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes sometidos a vitrectomía por retinopatía diabética proliferativa secundario a desprendimiento de retina traccional sin hemorragia vítrea.
- Pacientes sin antecedentes de cirugías oftalmológicas.

Criterios de exclusión

Grupo control

- Pacientes menores de edad.
- Pacientes que no sean sometidos a vitrectomía.
- Pacientes ajenos a la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
- Pacientes sometidos a vitrectomía por desprendimiento de retina regmatógeno y traccional secundario a procesos que involucren neovascularización.
- Pacientes diabéticos.
- Pacientes con desprendimiento de retina mixtos.

Grupo de estudio

- Pacientes menores de edad
- Pacientes que no sean sometidos a vitrectomía
- Pacientes ajenos a la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
- Pacientes sometidos a vitrectomía por desprendimiento de retina regmatógeno y traccional secundario a procesos que no involucren neovascularización.
- Pacientes con desprendimientos de retina mixtos
- Pacientes con hemorragia vítrea.

Variables de estudio

Nombre de la variable	Independiente o Dependiente	Tipo de variable: Nominal /ordinal/ dimensional	Unidad de medición	Instrumento de Medición	Momento de la medición
-----------------------	-----------------------------	---	--------------------	-------------------------	------------------------

Concentración de las diferentes isoformas de VEGF en vítreo. (VEGF-A, VEGF-B y VEGF-C)	Independiente	Ordinal	ng/dl	Lector de placas para ELISA	Único posquirúrgico
--	---------------	---------	-------	-----------------------------	---------------------

Variables dependientes:

Nombre de la variable	Independiente o Dependiente	Tipo de variable: Nominal /ordinal/ dimensional	Unidad de medición	Instrumento de Medición	Momento de la medición
Cantidad de vítreo analizado	Dependiente	Cuantitativa,	Unidades	mililitros	Posterior a vitrectomía.

Variables independientes

Nombre de la variable	Independiente o Dependiente	Tipo de variable: Nominal /ordinal/ dimensional	Unidad de medición	Instrumento de Medición	Momento de la medición
Edad	Independiente	Dimensional	Años cumplidos	Interrogatorio	Visita 1. Prequirúrgico
Sexo	Independiente	Nominal, dicotómica	Femenino/	Ficha de recolección.	Único

			Masculin o		
Pacientes sometidos a vitrectomía	Independiente	Nominal, dicotómica	Si/No	Ficha de recolección	Único
Diabetes Mellitus tipo II	Independiente	Nominal, dicotómica	Si/No	Ficha de recolección	Único
Concentración de la isoforma VEGF-A en vítreo.	Independiente	Numérica	ng / dl	Lector de placas para ELISA	Único posquirúrgico
Concentración de la isoforma VEGF-B en vítreo.	Independiente	Numérica	ng / ml	Lector de placas para ELISA	Único posquirúrgico
Concentración de la isoforma VEGF-C en vítreo.	Independiente	Numérica	ng / ml	Lector de placas para ELISA	Único posquirúrgico
Concentración de proteínas en vítreo	Independiente	Numérica	ng/ml	Técnica BCA	Único posquirúrgico

Tamaño de la muestra

Variable principal de desenlace: Cuantificación de VEGF-A, VEGF-B Y VEGF-C en vítreo.

El número de muestras incluidas en este estudio es de 52 muestras de vítreo de pacientes, 25 del grupo control y 25 del grupo de estudio.

Método

1. Se invitó a participar de manera voluntaria a 50 sujetos en la consulta de programación para vitrectomía en el área de retina del hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
2. 25 sujetos invitados fueron del grupo control, el cual involucra a pacientes sometidos a vitrectomía secundario a desprendimiento de retina traccional/regmatógeno secundario a procesos que NO involucren neovascularización en la consulta de programación para vitrectomía en el área de retina del hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
3. 25 sujetos invitados fueron el grupo de estudio, el cual involucra a pacientes sometidos a vitrectomía secundario a hemorragia vítrea o desprendimiento de retina traccional secundario a retinopatía diabética proliferativa en la consulta de programación para vitrectomía en el área de retina del hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
4. Se entregó y firmó consentimiento informado en la consulta de programación para vitrectomía en el área de retina del hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
5. Se realizó historia clínica en la consulta de programación para vitrectomía en el área de retina del hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
6. Los sujetos fueron sometidos a vitrectomía vía pars plana en el quirófano del hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
7. Se recabó de 0.2 ml a 1 ml de humor vítreo posterior a colocación de trócares, previo a la inserción de la infusión.
8. Se colocó la muestra posterior a su obtención en tubos cónicos de 2 ml y se transportó a la unidad de investigación en un contenedor cerrado a prueba de derrames a 4°C.
9. Se recibe la muestra en la unidad de investigación, se registra en la bitácora.
10. Se mide el volumen total de la muestra y se pasó a un tubo de 1.5 ml estéril.
11. Se centrifugó durante 15 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente, se toma el sobrenadante y se coloca en un tubo de 1.5 a 2 ml debidamente etiquetado.
12. Se guarda el sobrenadante en ultracongelación a -80°C hasta su procesamiento.
13. Para el análisis se escogieron muestras de forma aleatoria en el grupo de RDP y en el grupo control. Las muestras seleccionadas se descongelaron a temperatura ambiente para realizar las diferentes mediciones.
14. Las muestras de humor vítreo fueron procesadas para determinar la presencia y concentración de proteínas por técnica BCA.

15. La muestra de humor vítreo fue procesada mediante ELISA para determinar la presencia y los niveles de VEGF en sus diferentes isoformas -A,-B,-C en la Unidad de Investigación de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.
16. Se registraron los datos en una base de datos de Excel.
17. Los datos se analizaron mediante el programa EXCEL 2017 y SPSS versión 25.

Análisis estadístico

1. Se utilizó el software estadístico SPSS versión 25.
2. Se realizó una t de student para determinar si los resultados eran significativos o no significativos. Considerando una significancia estadística con la p menor a 0.05.
3. Se realizaron gráficas de cajas y bigotes para determinar la media, mediana, cuartiles y valores extremos.

Maniobras estandarizadas

Cuantificación de VEGF A, VEGF B y VEGF C mediante ELISA

Preparación de los reactivos

Se prepara un buffer que debe ser conservado a temperatura ambiente y debe ser diluido antes de empezar el procesamiento del test.

Si hay cristales en el buffer, se deben calentar hasta la disolución total.

1. Se debe agregar 50 mL del concentrado “buffer de lavado” en un cilindro de 1000mL. Posteriormente se debe llenar en su totalidad complementando con agua destilada.
2. Se debe mezclar evitando formar espuma.
3. Se transfiere a un bote limpio y se almacena a una temperatura entre 2°-25°.
4. El Buffer debe prepararse basado en la siguiente tabla.

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (20x) (mL)	Distilled Water (mL)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950
10x (1 - 12)	500	10000

Buffer de ensayo.

1. Verter todo el contenido (5 ml) del concentrado del buffer de ensayo en un cilindro de 100 ml, posteriormente llevar a los 100 ml con agua destilada.
2. Mezclar evitando formar espuma

3. Conservar entre 2° a 8°.
4. Se debe preparar basado en la siguiente tabla.

Number of Strips	Assay Buffer Concentrate (20x) (mL)	Distilled Water (mL)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

Conjugado de biotina

1. Se debe hacer una dilución 1:100 de la solución concentrada de biotina conjugada con el buffer de ensayo en un tubo de plástico según sea necesario basándose en la siguiente tabla:

Number of Strips	Biotin-Conjugate (mL)	Assay Buffer (1x) (mL)
1 - 6	0.06	5.94
1 - 12	0.12	11.88

VEGF-A,B,C

- 1) Reconstituir el estándar de VEGF-A, VEGF-B o VEGF-C humano mediante la adición de agua destilada.
- 2) Mezclar hasta que se vea una mezcla homogénea.
- 3) Dejar que el estándar se reconstituya durante 10 a 30 minutos.
- 4) Mezclar bien antes de hacer las diluciones
- 5) Las diluciones estándar se pueden preparar en el micropocillo o alternativamente en tubos.

Dilución estándar externa

1. Preparar diluciones en serie 1:2 para la curva estándar como siguiente:
Pipetear 225 uL de diluyente de muestra en cada tubo.
2. Pipetear 225 uL de estándar reconstituido (Concentración de estándar =2 ng/ml) en el primer tubo.
3. Pipetear 225 uL de esta dilución en el segundo tubo y mezclar.
4. Repetir las diluciones 5 veces.

Protocolo

1. Determine el número de tiras de micropocillos necesarios para probar el número deseado de muestras más el número apropiado de pocillos necesarios para ejecutar espacios en blanco y estándares. Cada muestra, estándar, la muestra de

control en blanco y opcional debe analizarse en duplicar. Retire las tiras de micropocillos adicionales del soporte y guárdelas en bolsa de aluminio con el desecante provisto a 2°-8°C sellado herméticamente.

2. Lave las tiras de micropocillos dos veces con aproximadamente 400 µL de buffer por pocillo con aspiración completa del contenido de los micropocillos entre lavados. Deje que el tampón de lavado se asiente en los pocillos durante aproximadamente 10 a 15 segundos antes de la aspiración. Después del último paso de lavado, vacíe los pocillos y coloque las tiras de micropocillos almohadilla absorbente o toalla de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado. Usar las tiras de micropocillos inmediatamente después del lavado. Alternativamente las tiras de micropocillos se pueden colocar boca abajo sobre un absorbente húmedo papel por no más de 15 minutos. No permita que los pozos se sequen.

3. Dilución estándar en la placa de micropocillos

Añada 100 µL de diluyente de muestras por duplicado a todos los pocillos estándar. Pipetear 100 µL de estándar preparado por duplicado en el pozo A1 y A2. Mezclar el contenido de los pocillos A1 y A2 por aspiración y eyección repetidas (concentración de estándar 1, S1 = 1000 pg/mL) y transfiera 100 µL a los pocillos B1 y B2, respectivamente. Tenga cuidado de no rayar el interior superficie de los micropocillos. Continúe este procedimiento 5 veces, creando dos filas de diluciones estándar de VEGF-A humano que van de 1000 a 15,6 pg/mL. Desechar 100 µL del contenido de la últimos micropocillos (G1, G2) utilizados.

7. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente. (18° a 25°C) durante 2 horas en un agitador de microplacas. (Temblar es absolutamente necesario para un rendimiento óptimo de la prueba.)

8. Prepare el conjugado de biotina.

9. Retire la película adhesiva y vacíe los pocillos. Lave las tiras de micropocillos 6 tiempos de acuerdo con el punto 2. del protocolo de prueba. Proceder inmediatamente al siguiente paso.

10. Agregue 100 µL de conjugado de biotina a todos los pocillos.

11. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente. (18° a 25°C) durante 1 hora en un agitador de microplacas.

12. Prepare Streptavidin-HRP

13. Retire la película adhesiva y vacíe los pocillos. Lave las tiras de micropocillos

del protocolo de prueba. Proceder inmediatamente al siguiente paso.

14. Añada 100 μ L de estreptavidina-HRP diluida a todos los pocillos, incluidos los pocillos en blanco.

15. Cubrir con una película adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18° a 25°C) durante 1 hora en un agitador de microplacas.

16. Retire la película adhesiva y vacíe los pocillos. Lave las tiras de micropocillos del protocolo de prueba. Proceder inmediatamente al siguiente paso.

17. Pipetee 100 μ L de solución de sustrato TMB en todos los pocillos.

18. Incube las tiras de micropocillos a temperatura ambiente (18° a 25°C) durante unos 30 minutos. Evite la exposición directa a la luz intensa.

El desarrollo del color en la placa debe ser monitoreado y en la reacción del sustrato se detuvo (ver el siguiente punto de este protocolo) antes los pocillos positivos ya no se pueden registrar correctamente. Determinación del período de tiempo ideal para el desarrollo del color tiene que hacerse individualmente para cada ensayo.

Se recomienda agregar la solución de parada cuando el nivel más alto estándar ha desarrollado un color azul oscuro. Alternativamente el color el desarrollo puede ser monitoreado por el lector ELISA a 620 nm.

La reacción del sustrato debe detenerse tan pronto como el Estándar 1 ha alcanzado una DO de 0,9 – 0,95.

19. Detenga la reacción enzimática pipeteando rápidamente 100 μ L de Stop Solución en cada pocillo. Es importante que la solución de parada sea esparcir rápida y uniformemente a través de los micropocillos para inactivar completamente la enzima. Los resultados deben ser leídos inmediatamente después de agregar la solución de parada o dentro de una hora si las tiras de micropocillos se almacenan a 2 - 8 °C en la oscuridad.

20. Lea la absorbancia de cada micropocillo en un espectrofotómetro usando 450 nm como la longitud de onda primaria (opcionalmente 620 nm como la longitud de onda de referencia; 610 nm a 650 nm es aceptable). Vacío el lector de placas de acuerdo con las instrucciones del fabricante por utilizando los pocillos en blanco. Determine la absorbancia de ambas muestras y los patrones.

Cuantificación de proteínas por técnica de BCA

Este kit está basado en el ácido bicinconínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales. Este método combina la reducción del Cu^{+2} (iones cúpricos) a Cu^{+1} (iones cuprosos) en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu^{+1} utilizando BCA. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA / Cu^{+1} . El complejo hidrosoluble absorbe a 562 nm de manera lineal con el incremento de proteína en un rango de 200-1000 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de proteínas se determina a partir de una curva de calibración construida con una proteína de referencia de concentración conocida (ej. albúmina de suero bovino). A partir de esta curva se determina la concentración de la muestra de proteína incógnita.

Materiales

- Solución Ácido bicinconínico
- Solución B Sulfato de cobre
- Agua destilada
- BSA proteína estándar
- Micropipetas
- Placa multipozos
- Espectrofotómetro

A. Preparación de soluciones patrón

1. Preparar los patrones en una placa de 96 pozos, diluyendo según indica la tabla. Conservar a 4°C.

H ₂ O (uL)	BSA (uL)
17	0
16.5	0.5
15.75	1.25
14.5	2.5
12	5
4.5	12.5
0	17

B. Preparación del Reactivo de Trabajo (se prepara al momento de ser usado)

1. Determinar el volumen de trabajo necesario con la siguiente fórmula: $(n^\circ \text{ de patrones} + n^\circ \text{ de muestras}) (n^\circ \text{ de réplicas}) \times 200 \mu\text{l} = V \text{ total}$
2. Preparar el reactivo de trabajo, mezclando 1 ml del reactivo A con 20 uL del reactivo B. Se obtendrá una solución verde.

C. Procedimiento para determinación de la concentración proteica

1. Adicionar 3 μl por well de cada muestra a analizar en una placa de 96 wells y mezclar con 17 μl de H₂O por well.
2. Adicionó 200 μl del reactivo de trabajo por well.
3. Se incubó a 37°C por 1 hora. Se observará un viraje de verde a violeta según la concentración de proteínas.

4. Enfriar la placa hasta temperatura ambiente. Determinar la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de placa. Nota: Si no se cuenta con el equipamiento adecuado, la reacción puede leerse entre 540 y 590 nm.

5. Graficar la absorbancia a 562 nm de los patrones en función de su concentración y obtener, por regresión lineal, la ecuación de la curva. Usar la ecuación obtenida para determinar la concentración de proteínas totales en las muestras (3).

Solución

Problema	Posible causa	Solución
No hay color en ningún pocillo.	La muestra contiene agentes quelantes de cobre.	Dializar, desalar o diluir la muestra. Incrementar la concertación del reactivo A en la sol de trabajo, p.ej. usar 50:2 de reactivo A:B
El blanco esta OK, pero los estándares y muestras dan menos color que lo esperado.	Ácidos fuertes o buffers alcalinos pueden alterar el pH del reactivo de trabajo. Se está midiendo en una longitud de onda errónea.	Dializar, desalar o diluir la muestra. Medir la absorbancia a 562 nm.
El color de las muestras aparecen más oscuras de lo esperado	La concentración de proteínas es demasiado alta. La muestra contiene lípidos o lipoproteínas.	Diluir la muestra. Agregar 2% de SDS a la muestra para eliminar los lípidos.
Todos los tubos (incluyendo el blanco) dan violeta oscuro.	El buffer contiene agentes reductores. El buffer contiene Tiol. El buffer contiene aminas biogénicas (catecolaminas).	Dializar o diluir la muestra.

Organización

Recursos humanos:

1. Investigador
2. Residente de segundo año
3. Pasante de servicio social en medicina
4. Becarios de retina

Recursos materiales:

1. Micropipetas
2. Gabinete de seguridad nivel II para manejo de muestras humanas.
3. Espectrofotómetro
4. Potenciómetro

5. Balanza analítica y balanza granataria
6. Agitador a 45°.
7. Centrífuga refrigerada
8. Kit de BCA para cuantificación de proteínas.
9. Kits de ELISA para determinación de VEGF-A, VEGF-B y VEGF-C.
10. Medio para mantenimiento de muestras
11. Ultrarefrigerador para almacenaje de muestras
12. Refrigerador para almacenaje de kits y reactivos
13. Tubos cónicos de 1.5 – 2 ml para recolección de muestra
14. Tubos de 15 ml para centrifugación de muestra
15. Computadora e impresora.
16. Tóner para impresión de historias clínicas y consentimiento informado
17. Hojas para elaboración de historias clínicas y consentimiento informado.

Aspectos éticos

El presente estudio ha sido diseñado con base a los principios de la Declaración de Helsinki y en apego a las guías de buena práctica clínica.

Todos los pacientes deberán firmar el consentimiento informado previo a su inclusión al estudio.

La privacidad del paciente será protegida a toda costa, recabándose solamente los datos que competen a la presente investigación.

Resultados

Se reclutaron 50 muestras de 50 pacientes que cumplieron con los criterios de selección previamente descritos. De esas 50 muestras, 25 fueron del grupo control y 25 del grupo de estudio, de las cuales se excluyeron 5 muestras de cada grupo por falta de consentimiento informado y contaminación.

Considerando que el objetivo principal de este proyecto es la determinación de algunas isoformas de proteínas con función vascular en vítreo de pacientes con RD, inicialmente se determinó y cuantifico la concentración de proteínas generales en las muestras (técnica de BCA, ver métodos) de los pacientes participantes para identificar la viabilidad de las muestras para este estudio. Como se observa en la figura 1, el grupo con retinopatía diabética proliferativa (RDP) no muestra una diferencia respecto

al grupo, con una concentración de 2.94 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 2.39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente, y lo cuál coincide con lo reportado en la literatura.

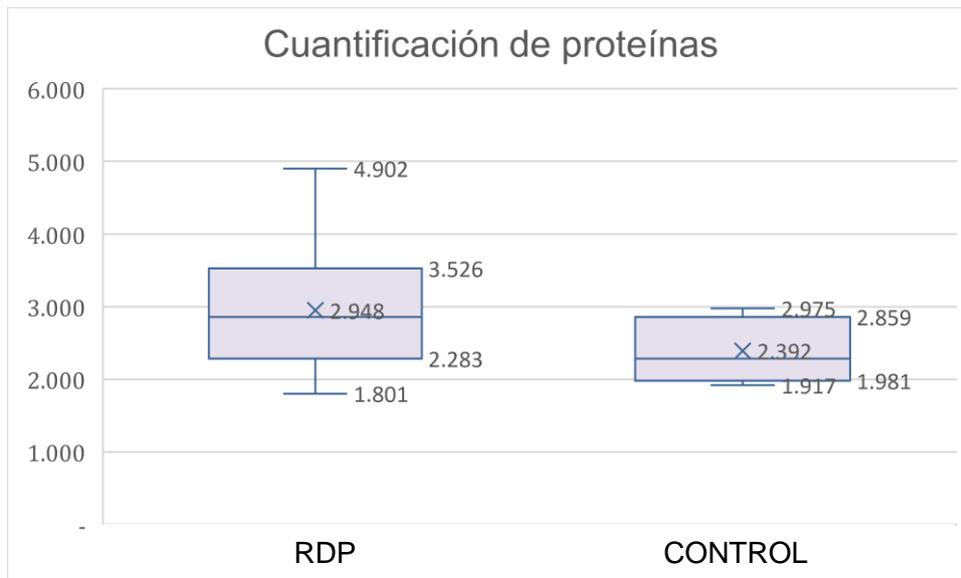


Figura 1. Cuantificación de proteínas por técnica BCA en pacientes con RDP contra el grupo control. Unidades en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

El análisis de la concentración de proteínas por género, muestra una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de mujeres y de hombres, siendo una concentración de 3.19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y de 2.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente (Figura 2). Posteriormente al subdividir en dos grupos: mujeres con y sin RDP, y hombres con y sin RPD se observó que únicamente en el grupo de mujeres se presenta una tendencia mayor en la concentración de proteínas con un promedio de 3.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en mujeres con RDP y de 2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para mujeres del grupo control, sin embargo, aparentemente no hay una diferencia significativa debido muy probablemente a la cantidad de muestra (N mujeres DM= 8 vs N mujeres control= 2). En el caso del grupo de hombres no se observó una diferencia entre pacientes con RDP y controles (Figura 2). Es importante aumentar la muestra para tener una mayor certeza en los análisis estadísticos.

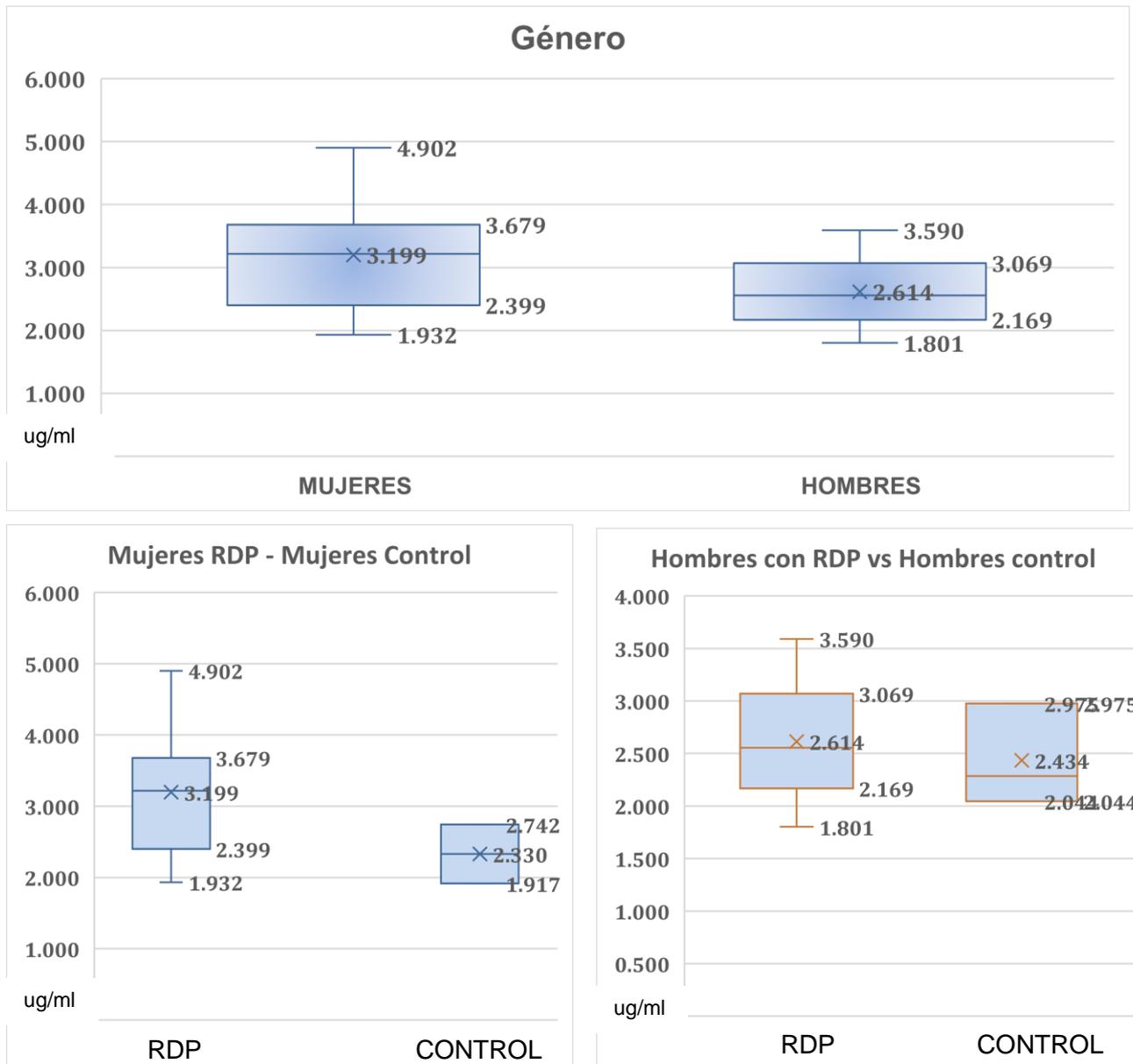


Figura 2. Análisis de la concentración de proteínas considerando género y pacientes con RDP y controles para cada grupo. Unidades de $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Estos resultados indican una clara diferencia en cuanto a la concentración de proteínas en el vítreo como se señala en la literatura, sin embargo, llama la atención algunas diferencias interesantes en el grupo de mujeres, considerando que algunos estudios consideran el sexo masculino como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de RDP, incluso algunos lo refieren como un factor de riesgo de progresión de la enfermedad en aquellos pacientes que ya tienen retinopatía diabética.^{28,29,30}

Una vez que se analizó la concentración de proteínas en los diferentes grupos de estudio y control, y se determinó la viabilidad del uso experimental de las muestras, se continuo en el análisis de las proteínas de interés, VEGF-A, VEGF-B y VEGF-C.

En la figura 3 se muestra la cuantificación de VEGF-A en pacientes con RDP comparados con el grupo control. Se observa que el vítreo de pacientes con RDP tienen una concentración de 314.62 pg/ml, y una desviación estándar (DE) de +/- 275.99, comparado con el grupo control que presenta una media de 62.50 pg/ml, y desviación estándar (DE) +/-138.26, con un p estadísticamente significativa (0.001). Este incremento en la concentración de VEGF era esperado en pacientes con RDP, y coincide con lo reportado por otros grupos de investigación.^{14,17.}

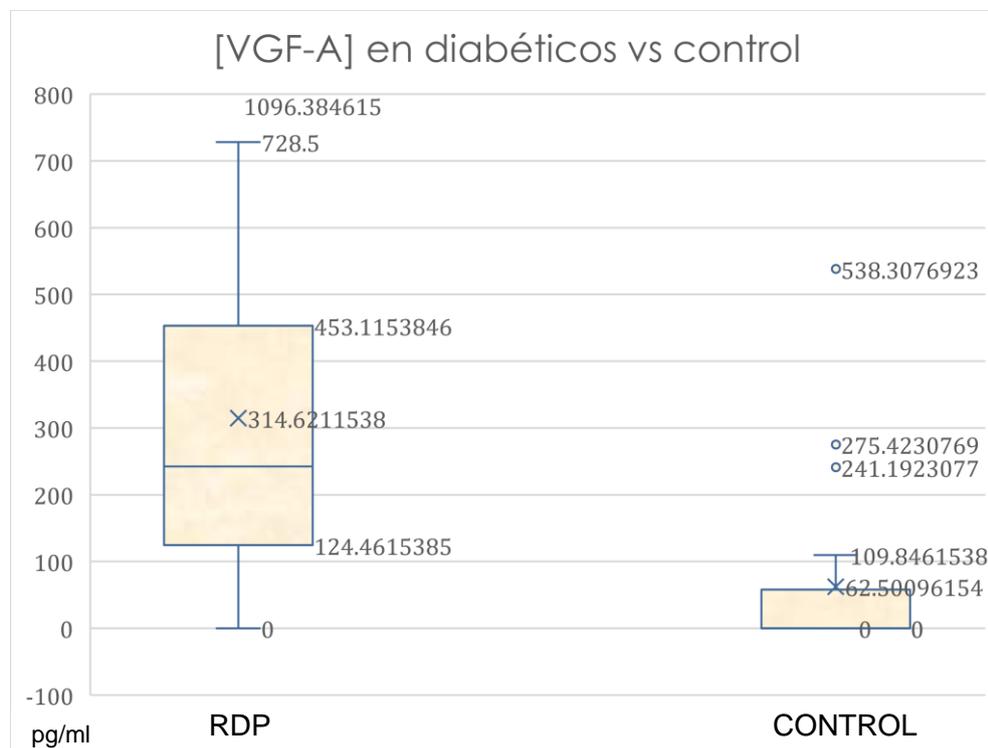


Figura 3. Comparación de concentración de VEGF-A en vítreo de pacientes con RDP contra el grupo control. Unidades de pg/ml.

Al realizar el análisis por género, se encontró una diferencia de las medias del grupo de mujeres de 223.90 pg/ml, con una DE +/- 275.08. Comparado con el grupo de hombres de 129.64 pg/ml, y DE +/- 197.62. Este resultado coincide con el análisis de la concentración de proteínas, pero en este caso una mayor concentración de VEGF-A en mujeres con RDP (Figura 4).

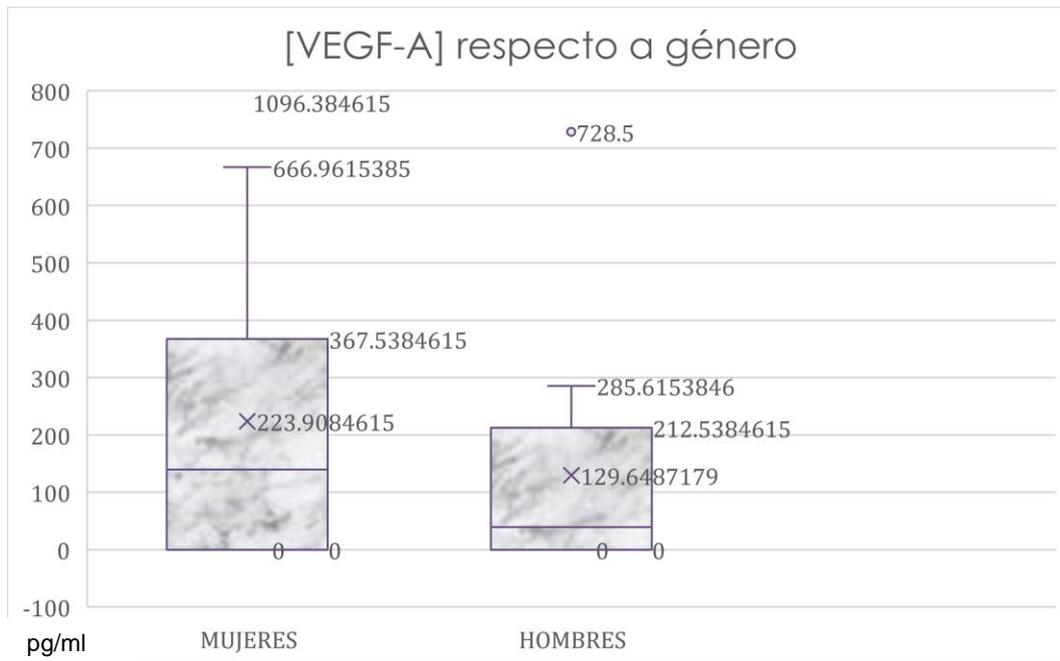


Figura 4. Comparación de medición de VEGF-A en pacientes hombres contra pacientes mujeres. Unidades de pg/ml.

Considerando que el VEGF-A es el principal factor angiogénico durante el desarrollo de la RDP, la principal estrategia clínica para el tratamiento es el uso de fármacos para disminuir la concentración de VEGF-A libre y evitar la generación de nuevos vasos sanguíneos. Es por esto por lo que en el estudio se consideró un grupo de pacientes tratados (6 semanas previas a la cirugía) con anti-VEGF-A y se compararon con pacientes no tratados. Como era de esperar, la concentración de VEGF-A en vítreo en pacientes tratados fue menor que en los que carecían de tratamiento, esto coincide con estudios previos y refuerza la validez de nuestro estudio (Figura 5).

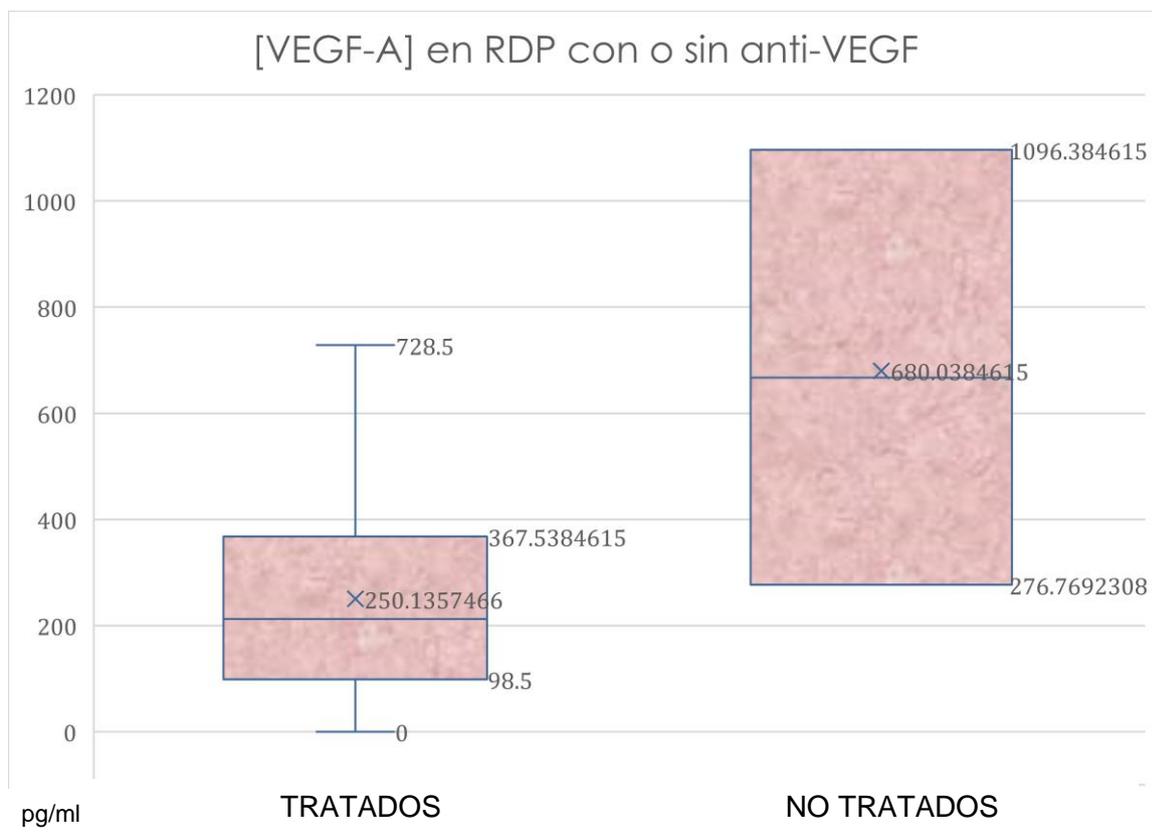


Figura 5. Concentración de VEGF-A en pacientes con RDP con y sin tratamiento de anti-VEGF 6 semanas previas a la cirugía. Unidades en pg/ml.

En los últimos años diferentes estudios han señalado la presencia y posible participación de ácidos grasos en el proceso degenerativo durante la RDP, por esta razón en el estudio se consideró a los pacientes que reportaron el uso de hipolipemiantes.^{31,32,33} Al subdividir el grupo de pacientes diabéticos de acuerdo a los tratados y no tratados con fármacos hipolipemiantes, se encontró una mayor concentración de VEGF-A en pacientes que sin tratamiento con hipolipemiantes comparados con los tratados, media de 351.52 ug/ml y 269.51 ug/ml, respectivamente (Figura 6).

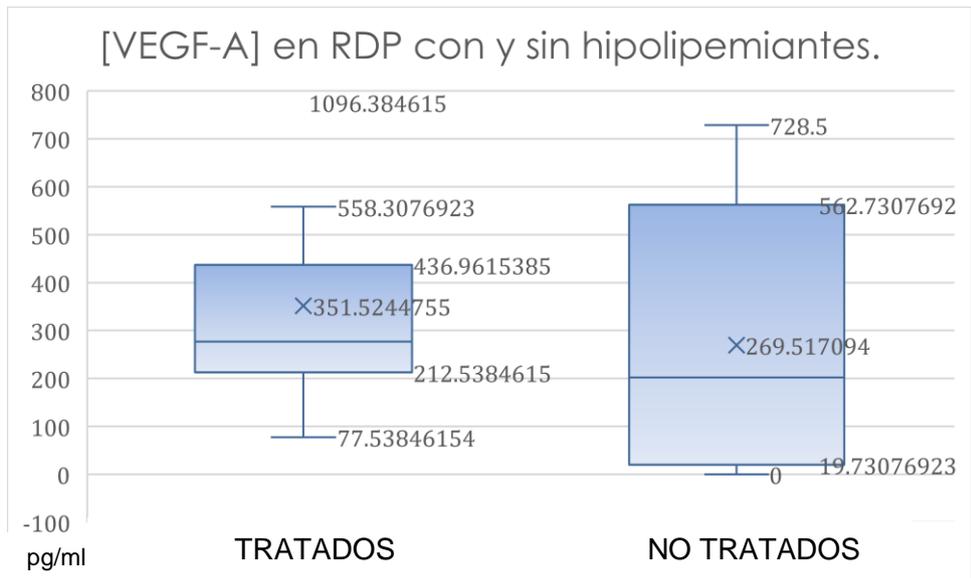


Figura 6. Concentración de VEGF-A en muestras de pacientes con RDP con y sin tratamiento con hipolipemiantes. Unidades en pg/ml.

En el caso del VEGF-B, se encontró una baja concentración de esta isoforma en ambos grupos de estudio, a pesar de que las muestras de pacientes con RDP tuvieron una mayor concentración (0.2325 ng/ml, DE +/- 0.93) respecto a los controles (0.0985 ng/ml, DE +/- .21571) esta diferencia no fue significativa ($p = 0.5$). Un mayor número de muestras en el control reportaron más presencia de VEGF-B. Al igual que los análisis de las otras isoformas de VEGF es necesario ampliar en número de muestras y realizar más estudios para fortalecer esta observación.

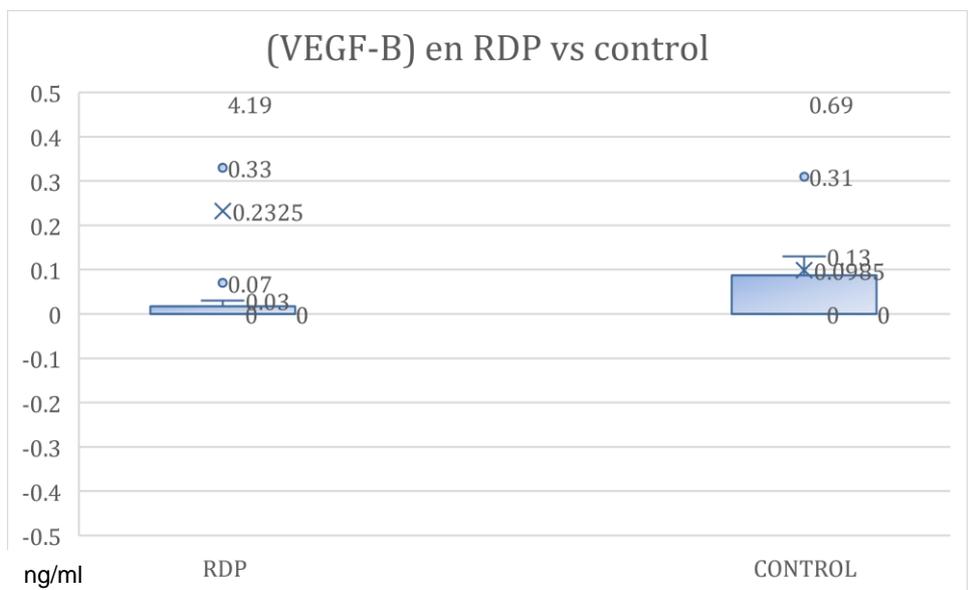


Figura 7. Concentración de VEGF-B en muestras de pacientes con RDP contra el grupo control. Unidades en ng/ml.

Inicialmente y considerando que los estudios realizados en nuestro grupo de investigación señalan un incremento en la expresión de VEGF-C en células de Müller en un modelo de retinopatía diabética in vitro (Medina-Arellano et al. en proceso) y una posible liberación de esta isoforma de VEGF hacia el vítreo debido a la comunicación vítreo-retinal, en este trabajo se determinó la presencia de esta isoforma de VEGF en el vítreo de pacientes con RDP. Los resultados del ensayo de ELISA no muestran presencia de la isoforma VEGF-C en las muestras utilizadas, a pesar de las observaciones en el modelo in vitro y de los pocos reportes al respecto que indican su presencia a bajas concentraciones¹⁴. Sin embargo, es necesario realizar más análisis al respecto para confirmar esta observación.

Discusión

La retinopatía diabética es la principal causa de discapacidad visual con mayor prevalencia en la población económicamente activa a nivel mundial. En estadios avanzados esta patología se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos a nivel retinal y un incremento en la fuga vascular, generando hemorragias y un aumento en la concentración de proteínas a nivel extracelular, entre otros procesos. Debido a la comunicación vítreo-retinal todo este exceso de contenido proteico se transporta hacia el vítreo en donde se concentra ejerciendo un efecto paracrino sobre la propia retina y otros tejidos oculares³⁴.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman este incremento en la concentración de proteínas en las muestras de vítreo de pacientes con RDP, sin embargo, a diferencia de lo reportado en la literatura en nuestra población este incremento fue mayor para mujeres que para hombre con una diferencia significativa ($p < 0.05$). Inclusive en el mismo grupo de mujeres comparando las pacientes con RDP y control, se observa este incremento en las proteínas en vítreo, lo que estaría indicando que en la población mexicana aparentemente habría una mayor susceptibilidad al proceso degenerativo en mujeres que en hombres. Esto podría deberse a una cuestión hormonal, en donde debido a la edad de nuestro grupo de mujeres (>55 años) estaría asociado un proceso postmenopáusico. Por ejemplo, algunos estudios señalan un incremento de proteínas, involucradas a la señalización de Ca, en la hemoglobina sérica²⁴, sin embargo, no hay reportes en fluidos como el vítreo. En el grupo de hombres no se observó ningún cambio entre pacientes con

RDP y controles. Es necesario incrementar el tamaño de muestra, principalmente para el grupo de hombres para determinar con mayor certeza los cambios en la concentración de proteínas en pacientes con RDP.

Una de las proteínas que incrementan su concentración en vítreo durante la evolución de la RDP es el VEGF-A. En nuestro caso, al analizar la concentración de este factor angiogénico, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras de pacientes con RDP respecto al grupo control, lo cual se ha reportado en la literatura.^{13,14,15,17} Interesantemente, hay una diferencia significativa entre género, en donde el incremento en VEGF-A es mayor en mujeres con RDP que en hombres con RDP, este resultado coincide con el incremento en la concentración de proteínas en el grupo de mujeres comparado con el grupo de hombres. Esta observación es de llamar la atención porque parecería que en nuestra población de estudio las mujeres pudieran presentar un mayor efecto degenerativo que los hombres, lo cual podría estar asociado factores como el estado hormonal, por ejemplo, una posibilidad es una disminución en la hormona de prolactina y sus metabolitos (vasoinhibinas) que se sabe tiene funciones neuroprotectoras en diferentes retinopatías, incluyendo la retinopatía diabética^{35,36}. Por lo tanto, es necesario realizar otros análisis para determinar si existe realmente una diferencia en género respecto a la susceptibilidad de la RDP en la población mexicana.

La asociación entre ácidos grasos y el incremento de factores angiogénicos como VEGF-A en RDP es una hipótesis que ha tomado fuerza en los últimos años. Cuando analizamos dentro de nuestra población las muestras de pacientes con RPD que usan hipolipemiantes en relación a los que no son tratados observamos un incremento significativo de VEGF-A en los pacientes que no usan hipolipemiantes comparados con los que si llevan tratamiento. Esto podría sugerir un efecto de los ácidos grasos en la liberación de VEGF-A en pacientes con RDP reforzando la hipótesis acerca de participación de ácidos grasos en el proceso degenerativo. Un estudio realizado por Katah Itoh, 2021, se determinó en vítreo de pacientes con RDP un incremento la concentración de VEGF-A y de FABP4, una chaperona de ácidos grasos citoplásmicos relacionada a la evolución de arterosclerosis y resistencia a la insulina^{26, 27}. Por otro lado, los estudios en realizados en un modelo de retinopatía diabética metabólica in vitro de nuestro laboratorio señalan que la presencia de ácidos grasos

como triglicéridos y palmitato inducen un incremento en la síntesis y liberación de VEGF-A de células de Müller en cultivo.³

La isoforma de VEGF-B no presenta una actividad angiogénica, pero se sabe que juega un papel importante como neuroprotector en la retina, regulando el proceso apoptótico en condiciones hiperglucemiantes^{18,19,20}. Sin embargo, aunque algunos trabajos sugieren un incremento de esta isoforma en pacientes con un estadio proliferativo de la retinopatía diabética, estos no son concluyentes. En nuestro caso observamos bajas concentraciones de VEGF-B en las muestras de pacientes con RDP, e inclusive en algunos controles. Esto podría sugerir la síntesis o liberación de este factor se encuentra regulada a la baja en condiciones de RDP, disminuyendo su actividad antiapoptótica y antiangiogénica, y en consecuencia favoreciendo el incremento en la concentración de VEGF-A y de la neovascularización. Con estos resultados pretendemos estudiar cuales son las características de los controles en donde se encontró el VEGF-B y de esta forma determinar si existe una relación entre la presencia de esta isoforma con el desarrollo de la RDP.

Otra de las isoformas analizadas fue el VEGF-C, y a diferencia del VEGF-A aparentemente no hay presencia de este factor en las muestras de vítreo de nuestra población de estudio. Esto es contradictorio a los de por si escasos reportes acerca de esta isoforma y a los datos obtenidos en el sistema in vitro de nuestro grupo de investigación¹⁴. En nuestros ensayos in vitro las células expuestas a condiciones de retinopatía diabética forman estructuras vesiculadas de liberación que son positivas a la marca fluorescente para el VEGF-C, por lo que una posibilidad es que en vítreo la isoforma VEGF-C se encuentre contenida en estructuras como exosomas y no de forma soluble por lo que no fué detectable por ELISA. Es imperativo utilizar otras técnicas de estudio que nos permitan analizar la presencia de exosomas y su contenido en los vítreo de pacientes con RDP y determinar la participación del VEGF-C.

Un factor importante que considerar en la detección de estas isoformas es la sensibilidad de los kits utilizados para cada isoforma de VEGF. Por otro lado, la probabilidad de que algunos estos factores o una fracción de ellos no se encuentren de forma soluble, hace necesario el abordaje a través de otras estrategias

experimentales para determinar su presencia y participación en la vítreo-retinopatía diabética.

Por último, la importancia de analizar el VEGF-A, VEGF-B y VEGF-C, en población mexicana, radica en que la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera no reversible en nuestro país con una prevalencia de hasta el 31.5% en pacientes diabéticos mexicanos²⁵. Por lo que el entender un poco más de la fisiopatología en la raza mexicana, permite establecer un punto de partida para el desarrollo de medicamentos, fármacos y anti angiogénicos más dirigidos contra no sólo el VEGF-A, sino el VEGF-B e incluso el C como blanco terapéutico.

Conclusiones

Es el primer estudio que se reporta en la literatura donde se analiza el comportamiento del VEGF en vítreo de pacientes mexicanos con retinopatía diabética proliferativa (RDP). Tomando en cuenta que la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera no reversible en nuestro país, y el costo económico que representa para el sistema de salud mexicano, el uso de este protocolo siembra las bases, por lo menos en nuestra institución para el desarrollo de posteriores estudios que puedan llevar a buscar soluciones en el control y desarrollo de esta retinopatía.

El aumento de la concentración de proteínas, así como en VEGF-A en pacientes femeninos probablemente debido a efectos hormonales, como la menopausia (edad media de 55 años), es una hipótesis que se deberá confirmar ampliando el estudio a pacientes femeninas que no se encuentren en periodo de menopausia o con una media debajo de los 45 años.

Las observaciones obtenidas en pacientes con el uso de hipolipemiantes, aunado a lo reportado por otros autores, refuerza la idea de la participación de ácidos grasos en el desarrollo de la RDP. Estos datos son importantes a considerar para establecer un adecuado manejo clínico de la patología en pacientes diabéticos y evitar o enlentecer el desarrollo de la RPD. Otro punto que confirma este trabajo es la importancia del VEGF-A como el principal factor involucrado en el proceso de neovascularización en RDP. Sin embargo, es necesario conocer la función de las

otras isoformas para poder determinar algún posible mecanismo que pueda regular a nivel de expresión o liberación la isoforma VEGF-A, considerando la función las isoformas antiangiogénicas (VEGF-B) bien de las isoformas involucradas en procesos inflamatorio (VEGF-C) que exacerban el cuadro patológico.

A pesar de la escasa y nula detección de VEGF-B y VEGF-C, respectivamente, es imprescindible el uso de otros análisis que nos permitan discernir la participación de otros mecanismos involucrados en la síntesis, liberación y acción de estas isoformas. Con esto se podrá tener un mayor entendimiento de la patología y establecer estrategias que puedan controlar la neovascularización a través de la regulación de diferentes blancos farmacológicos, lo que haría más eficiente la estrategia actual de únicamente disminuir el VEGF-A.

Referencias bibliográficas:

1. Tahergorabi Z, Khazaei M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci.* 2012;15(6):1110-1126. doi:10.22038/ijbms.2012.4929
2. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells, Mol Dis.* 2007;38(3):258-268. doi:10.1016/j.bcmd.2006.12.003
3. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1994;118(4):445-450. doi:10.1016/S0002-9394(14)75794-0
4. Mesquita J, Castro de Sousa J, Vaz-Pereira S, et al. VEGF-B Levels in the Vitreous of Diabetic and Non-Diabetic Patients with Ocular Diseases and Its Correlation with Structural Parameters. *Med Sci.* 2017;5(4):17. doi:10.3390/medsci5030017
5. Stalmans I, Ng YS, Rohan R, et al. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest.* 2002;109(3):327-336. doi:10.1172/JCI0214362
6. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology.* 2003;110(9):1677-1682. doi:10.1016/S0161-6420(03)00475-5
7. Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007. doi:10.1155/2007/43603
8. Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(1):23-33. doi:10.1016/j.tem.2013.09.005
9. Pulido JE, Pulido JS, Erie JC, et al. A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007. doi:10.1155/2007/36150
10. Wong TY, Cheung CMG, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2(March). doi:10.1038/nrdp.2016.12
11. Liberman B, Moura RA, Abujamra S. Diabetic retinopathy. *Rev Paul Med.* 1974;83(5):235-238.
12. Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C. Angiogenic and Antiangiogenic Factors in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2006;2(1):71-98. doi:10.2174/157339906775473671
13. Burgos R, Simó R, Audí L, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 1997;40(9):1107-1109. doi:10.1007/s001250050794
14. Kovacs K, Marra K V., Yu G, et al. Angiogenic and inflammatory vitreous biomarkers associated with increasing levels of retinal ischemia. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(11):6523-6530. doi:10.1167/iovs.15-16793
15. Chen HJ, Ma ZZ, Li Y, Wang CG. Change of Vascular Endothelial Growth Factor Levels following Vitrectomy in Eyes with Proliferative Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/6764932
16. Rasier R, Gormus U, Artunay O, Yuzbasioglu E, Oncel M, Bahcecioglu H. Vitreous levels of VEGF, IL-8, and TNF- α in retinal detachment. *Curr Eye Res.* 2010;35(6):505-509. doi:10.3109/02713681003597248
17. Citirik M, Kabatas EU, Batman C, Akin KO, Kabatas N. Vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in proliferative diabetic retinopathy versus proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res.* 2011;47(1):7-12. doi:10.1159/000324200
18. Li X, Lee C, Tang Z, et al. VEGF-B. 2009;3(4):322-327.

19. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2576-2581. doi:10.1073/pnas.93.6.2576
20. Karpanen T, Bry M, Ollila HM, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy. *Circ Res*. 2008;103(9):1018-1026. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.178459
21. Zhang F, Tang Z, Hou X, et al. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6152-6157. doi:10.1073/pnas.0813061106
22. Cao Y, Linden P, Farnebo J, et al. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(24):14389-14394. doi:10.1073/pnas.95.24.14389
23. Landgren E, Schiller P, Cao Y, Claesson-Welsh L. Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C- γ and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene*. 1998;16(3):359-367. doi:10.1038/sj.onc.1201545
24. Nordin BE, Need AG, Morris HA, O'Loughlin PD, Horowitz M. Effect of age on calcium absorption in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2004 Oct;80(4):998-1002. doi: 10.1093/ajcn/80.4.998. PMID: 15447911.
25. Prado-Serrano, A., Marilu, D., Guido-Jiménez, A., Jiny, D., & Camas-Benítez, T. (2009). Prevalencia de retinopatía diabética en población mexicana. In *Rev Mex Oftalmol*; Septiembre-Octubre (Vol. 83, Issue 5). www.medigraphic.org.mx
26. Itoh, K., Furuhashi, M., Ida, Y., Ohguro, H., Watanabe, M., Suzuki, S., & Hikage, F. (2021). Detection of significantly high vitreous concentrations of fatty acid-binding protein 4 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91857-1>
27. Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil GS, Rubinstein M. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues. *Diabetes*. 2014 Mar;63(3):900-11. doi: 10.2337/db13-0436. Epub 2013 Dec 6. PMID: 24319114.
28. Varma R, Macias GL, Torres M, Klein R, Pea FY, Azen SP, et al. Biologic risk factors associated with diabetic retinopathy: the Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmology* 2007;114:1332–1340.
29. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, Turner RC, Holman RR, Manley SE, et al. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 2001; 44:156–163.
30. Ozawa GY, Bearse MA Jr, Adams AJ. Male-female differences in diabetic retinopathy? *Curr Eye Res*. 2015 Feb;40(2):234-46. doi: 10.3109/02713683.2014.958500. Epub 2014 Dec 29. PMID: 25545999.
31. Behl T, Kaur I, Kotwani A. Role of leukotrienes in diabetic retinopathy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2016 Jan;122:1-9. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.12.001. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26673555.
32. Behl T, Kaur I, Kotwani A. Role of leukotrienes in diabetic retinopathy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2016 Jan;122:1-9. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.12.001. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26673555.

- 33 Behl T, Kaur I, Kotwani A. Role of leukotrienes in diabetic retinopathy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016 Jan;122:1-9. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.12.001. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26673555.
- 34 Nawaz IM, Rezzola S, Cancarini A, Russo A, Costagliola C, Semeraro F, Presta M. Human vitreous in proliferative diabetic retinopathy: Characterization and translational implications. *Prog Retin Eye Res.* 2019 Sep;72:100756. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.03.002. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30951889.
- 35 Triebel J, Macotela Y, de la Escalera GM, Clapp C. Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB Life.* 2011 Oct;63(10):806-10. doi: 10.1002/iub.518. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21913303.
- 36 Arnold E, Rivera JC, Thebault S, Moreno-Páramo D, Quiroz-Mercado H, Quintanar-Stéphano A, Binart N, Martínez de la Escalera G, Clapp C. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes.* 2010 Dec;59(12):3192-7. doi: 10.2337/db10-0873. Epub 2010 Sep 7. PMID: 20823101; PMCID: PMC2992782.
- 37 Medina-Arellano, A.E.(2021) Efecto de la hiperglicemia/hiperlipidemia sobre la expresión de los receptores a GABA de la célula de Müller de mamífero [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México].