



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA
(INRLGII)**

Campo de Conocimiento: Oftalmología.

**“Análisis de expresión diferencial de miRNAs en vítreo y suero de pacientes
diabéticos mexicanos con micro-angiopatías de retina en comparación con
patologías maculares idiopáticas”.**

TESIS

que para optar por el grado de

Doctor en Ciencias Médicas

PRESENTA:

Mtra. ADRIANA SOLÍS VIVANCO

Tutor

Dr. Alberto Hidalgo Bravo

Instituto Nacional de Rehabilitación LGII

Comité Tutor

Dr. Jans Fromow Guerra

Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P

Dra. Margarita Valdés Flores

Instituto Nacional de Rehabilitación LGII

Ciudad de México, abril de 2023.



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.

Instituciones Participantes.

Departamento de Oftalmología, Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), Calzada México-Xochimilco 289, Arenal de Guadalupe, 14389 Ciudad de México, México.

Departamento de Medicina Genómica, Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), Calzada México-Xochimilco 289, Arenal de Guadalupe, 14389 Ciudad de México, México.

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610 Ciudad de México, México.

Centro de Atención Integral del Paciente con Diabetes (CAIPaDI), Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Secc 16, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, México.

Dedicatoria.

A Dios. Por las bendiciones de cada día.

A mis hijos.

A mi hija Andie. Porque eres mi motor para luchar y seguir. Porque todo lo que hago es para las dos y porque quiero que con mi ejemplo comprendas que todo en lo que pones tu Fe, tu intención y tu dedicación, se logra. Que todo lo que se empieza se termina, por más dificultades que se te presenten; porque somos fuertes y resilientes y en especial, porque nos tenemos. Porque siempre me tendrás para ti.

Gracias por tu paciencia y por el tiempo que no estuve contigo por lograr este proyecto.

A mi hijo Carlo. Porque tu paso por mi vida me transformó. Gracias por estar siempre a nuestro lado y dentro de mí.

A mis padres. Hilda y Rodolfo. Sin su amor, nada de lo que soy sería. Todo se los debo. Cada escalón que avanzo es para y por ustedes. Rezo por estar en cada momento en que pueda darles ese amor de regreso. Los amo infinitamente. Gracias por su ejemplo.

A mis hermanos. Hilda y Rodolfo. Con todo mi amor y mi admiración para ambos. Porque nunca se rinden y cada uno me enseña de paciencia y de tenacidad. Todos los días.

Ustedes, junto con sus familias que amo, son un pilar en mi existencia.

A Margarita Valdés Flores. En este camino de la investigación, y en el camino de la resiliencia, mi mentora. Porque alguna vez en vida te agradecí tu apoyo en un momento en que me sentía estancada y perdida. Porque supiste entenderme y guiarme. Aún así, sé que debí agradecerte más. Reconocerte más. Te extraño y me harás mucha falta en la culminación de este proyecto. Dejaste una huella grande en los que te conocimos y quisimos. Gracias, gracias, gracias.

A Miguel. Con tanta admiración por tu éxito. Te veo hacia arriba con ganas siempre de llegar a donde estás. Alcanzando todo sin descuidar nada y siempre con la mejor actitud. Siempre para adelante. Por eso la vida te da y te da más. Gracias por tu cariño y por estar para mí siempre.

A Gerardo. Porque tu cariño es parte del andar de Andie y mío todos los días. Gracias por tu ejemplo. Comenzamos juntos este camino del Doctorado y te me adelantaste al final. Y te lo agradezco. Siempre enseñándonos el camino uno al otro para llegar del otro lado. Agradezco a Dios por el día en que te conocí. Mi máximo mejor amigo. Un regalo del cielo.

A mi tutor. Alberto. Te agradezco no haberme dejado abandonar el camino. Gracias por no tomar en serio nunca mis razones para abortar la misión. En el fondo anhelaba llegar hasta aquí y supiste entenderme y guiarme. Siempre con una sonrisa a pesar de ser tu alumna la difícil, la de la vida compleja. Este logro es de ambos y deseo que te genere muchos más en tu camino como investigador. En verdad GRACIAS.

ÍNDICE

Rubro	Página
Resumen	5
Marco Teórico	6
Justificación	12
Planteamiento del Problema	13
Pregunta de Investigación	13
Objetivo General	13
Hipótesis General	13
Material y Método	14
Resultados	17
Discusión	23
Conclusiones	26
Perspectivas	27
Referencias	28
Anexo 1	34
Anexo 2	35
Anexo 3	42
Anexo 4	43
Anexo 5	44
Agradecimientos	46

Resumen.

La microangiopatía en retina representa la complicación ocular con mayor potencial discapacitante en el paciente diabético en México. Los micro-RNAs (miRNAs) han surgido como importantes reguladores de la expresión génica asociada a múltiples enfermedades. El objetivo de este estudio fue analizar mediante TaqMan Low Density Arrays (TLDA), la expresión de miRNAs en suero y vítreo de pacientes diabéticos con microangiopatía retiniana establecida. Los pacientes se agruparon de la siguiente manera: Retinopatía diabética proliferativa (RDP), Edema macular diabético (EMD) y Membrana epi-retiniana idiopática (MER) como controles no diabéticos. Se reclutaron 16 pacientes con RDP, 17 con EMD y 23 con MER. Todos ellos con indicación de vitrectomía vía pars plana. Se obtuvieron muestras de sangre total y vítreo para la extracción de RNA total. El perfil de expresión de los miRNAs se analizó utilizando los arreglos de baja densidad (TLDA) y dichos resultados se sometieron a un análisis de validación con la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real. Los genes diana se identificaron mediante herramientas bioinformáticas. Se realizó un análisis de enriquecimiento para identificar las vías metabólicas sobre-representadas por los genes diana de los miRNAs con expresión diferencial. Tres miRNAs destacaron en su expresión diferencial en suero al comparar RDP vs MER: hsa-miR-320a-3p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-375-3p y dos en vítreo: hsa-miR-541-5p y hsa-miR-223-5p. Cuatro miRNAs se expresaron diferencialmente en suero comparando los grupos EMD y MER: hsa-miR-486-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-197-3p y hsa-miR-125b-5p y uno en vítreo: hsa-miR-212-3p. Curiosamente, cuando se compararon ambos grupos de diabéticos, RDP vs EMD, se expresaron diferencialmente cinco miRNAs en suero: hsa-miR-486-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-660-5p y hsa-miR-145. La validación se llevó a cabo mediante qPCR utilizando ensayos triples TaqMan en el resto de las muestras. La expresión se confirmó después de la validación de hsa-miR-145, hsa-miR-92a y hsa-miR-375 en suero. Ninguno de los miRNAs expresados en el vítreo obtuvo una validación por qPCR exitosa. El análisis de enriquecimiento reveló la participación de vías relacionadas con el factor de crecimiento endotelial vascular y su receptor (VEGFA/VEGFR), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), el factor de crecimiento epidérmico (EGF/EGFR), la adhesión focal y la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K-Akt), entre otros. Estas vías tienen una implicación directa en la fisiopatología de la RDP y el EMD. Nuestros resultados apoyan la implicación de los miRNAs en la fisiopatología de ambas manifestaciones de la microangiopatía diabética de retina y refuerzan su potencial como biomarcadores o recursos terapéuticos.

Palabras clave. Retinopatía diabética proliferativa. Microangiopatía diabética. Edema macular diabético. miRNAs. Vítreo. Suero. Genes diana.

Marco Teórico.

Epidemiología.

La diabetes mellitus es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial. De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología, en 2012 se reportaron 418797 pacientes (incidencia anual) con diabetes en México, lo que representó el 0.4% de la población, siendo el grupo etario de 50-59 años de edad el más afectado, con una tasa de morbilidad de 1,237.90 casos por cada 100 mil habitantes. Se estima que para el 2030 haya un aumento del 37.8% en el número de personas afectadas. Se calcula que el 25% de los pacientes con diabetes desarrollan algún tipo de discapacidad. Dentro de este grupo de pacientes, la discapacidad visual ocupa el segundo lugar afectando al 40%, sólo por detrás de la discapacidad motora que afecta al 49%. (Ojeda et al., 2012). A nivel mundial, el Edema Macular Diabético (EMD) es la causa principal de pérdida visual asociada a Diabetes. Hay aproximadamente 93 millones de personas con Retinopatía Diabética (RD). De ellas, 17 millones tienen RD proliferativa. (Lee et al., 2015). La prevalencia global del EMD es de 6.81%, de los cuales el 12% corresponderán a nuevos casos de ceguera legal anualmente. De acuerdo a la historia natural del EMD, se espera que el 24% de los ojos que lo padecen, pierdan al menos 3 líneas de visión a tres años. La prevalencia del EMD depende del tipo y duración de la diabetes. La discapacidad visual ocupa el segundo lugar entre las complicaciones diabéticas, afectando al 40% de los pacientes (Yau et al., 2012).

En pacientes con Diabetes tipo I, el EMD ocurre en los primeros 5 años posteriores al diagnóstico, con una prevalencia posterior elevada gradualmente hasta llegar al 40% a 30 años del diagnóstico; pero se ha determinado tan alta como el 27% a 9 años del mismo. (Angelica and Fong, 2008) Por otro lado, cerca del 5% de los pacientes con DM tipo II ya tienen EMD al momento del diagnóstico, incrementándose gradualmente al 30% en 25 años. (Zhang, 2014).

Microangiopatías de retina en el paciente diabético.

Las microangiopatías que afectan la retina del paciente diabético son dos: La Retinopatía Diabética (RD) y el Edema Macular Diabético (EMD). Ambas representan dos de las complicaciones más discapacitantes, ya que la primera progresa a desprendimiento de retina y glaucoma neovascular, y la segunda afecta la visión central. En ocasiones, el edema se cataloga como "Edema Macular Diabético Difuso", el cual produce un engrosamiento generalizado del área macular y representa el tipo de edema más difícil de tratar. Ver figuras ilustrativas a continuación.

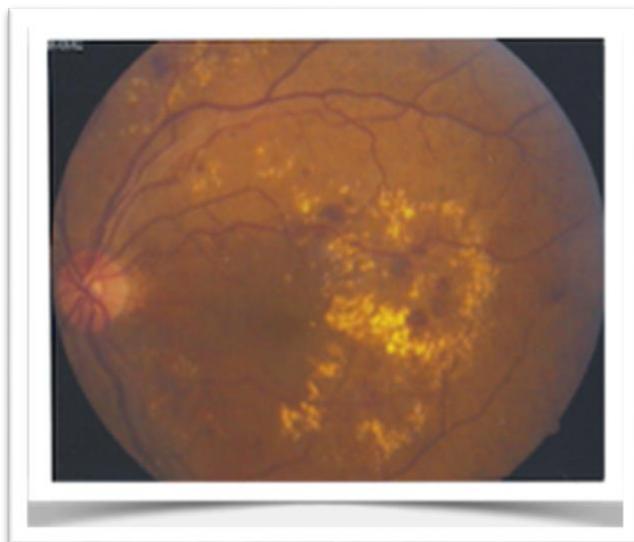
Fig. 1 Retinopatía Diabética Proliferativa Avanzada.



La imagen de la izquierda muestra la presencia de vasos de neoformación en toda la superficie de la retina, además de la presencia de una hemorragia subhialoidea en el sector nasal.

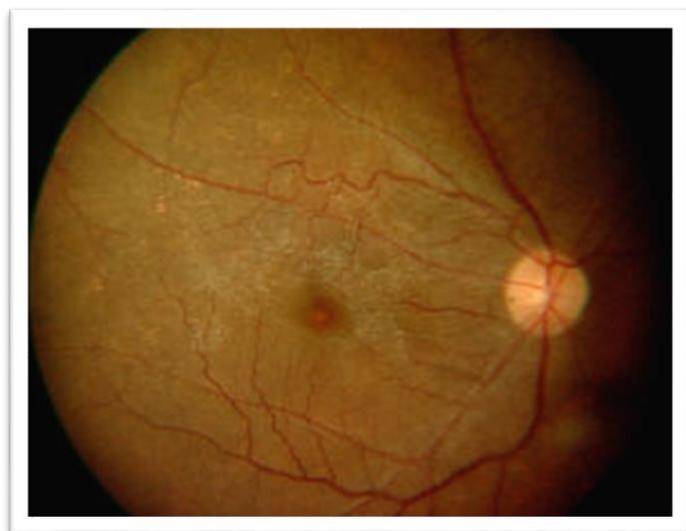
La imagen de la derecha muestra una fase más avanzada del padecimiento, con fibrosis que parte del nervio óptico y que compromete el área macular, traccionando la arcada temporal superior. Se aprecian múltiples hemorragias intra-retinianas, así como otra subhialoidea en la superficie de la membrana fibro-vascular a nivel de la papila del nervio.

Fig. 2 Edema Macular Diabético Difuso.



Se puede apreciar en la imagen la presencia de múltiples exudados duros dentro del área macular, a menos de 500 micras de la fovea. Se aprecian también, hemorragias intra-retinianas y micro-aneurismas. Es evidente el arrosariamiento venoso y la atenuación del calibre arteriolar. Todas las anteriores, características típicas de la Retinopatía Diabética Severa con Edema Macular Clínicamente Significativo.

Fig. 3 Membrana Epi-retiniana Idiopática. (Grupo Control sin DM).



Se puede notar la distorsión de los vasos sanguíneos generada por la tracción proveniente de la membrana epi-retiniana.

Dicha membrana se muestra como un brillo “celofánico” en la superficie de la mácula. La vitrectomía es necesaria para removerla y eliminar el sintoma de metamorfopsia.

Actualmente el diagnóstico de RD y de EMD difuso es clínico (bajo observación de la lámpara de hendidura). La cirugía (vitrectomía) está indicada en ambos cuando está presente una hemorragia vítrea o cuando coexiste tracción que atente la integridad macular con o sin hemorragia. (Berrocal et al., 2016). En caso del edema macular, las opciones de tratamiento incluyen inyecciones intravítreas de algún esteroide o antiangiogénico, la terapia basada en la aplicación de láser o la cirugía (vitrectomía con remoción de hialoides posterior y limitorrexis).(Mathew et al., 2015). Esta última es una opción terapéutica frecuente ya que diversos estudios demuestran el beneficio de la limitorrexis o pelaje de la membrana limitante interna de la retina en la zona macular, la cual promueve la liberación y/o producción de factores reparadores del “daño” a nivel de las células de Müller, lo cual mejora de manera considerable el espesor de la zona macular y promueve la mejor absorción y acción de los medicamentos intravítreos. La remoción de la hialoides posterior y la limitorrexis han demostrado importantes beneficios: mejoría estructural, disminución en recaídas y mayor respuesta al tratamiento convencional posterior a la cirugía.(Ivastinovic et al., 2021) (Hu et al., 2018)(Crim et al., 2017). El estudio que otorga la información completa a nivel estructural es la Tomografía de Coherencia Óptica (OCT), la cual es utilizada también en el seguimiento de los pacientes bajo tratamiento.

Existen muchas preguntas con respecto al EMD, como la relacionada a los factores genéticos que llevan a un paciente a ser mucho más susceptible de desarrollarlo. Con frecuencia se observan pacientes que, incluso en coexistencia de una Retinopatía No Proliferativa Leve o Moderada, desarrollan el EMD, lo que contrasta con aquellos pacientes que a pesar de su estadio avanzado de Retinopatía Diabética (RD), nunca desarrollan EMD o expresan una forma muy leve y tratable del mismo.

Muchos factores sistémicos de riesgo se han identificado en estudios epidemiológicos basados en población. En pacientes menores a 30 años, los factores de riesgo independientes para EMD incluyen duración de la diabetes, proteinuria, género, historia de enfermedad cardiovascular, uso de diuréticos y HbA1C elevada. En pacientes mayores de 30 años, la incidencia de EMD está asociada a duración de la diabetes, presión sistólica elevada y HbA1C elevada. La proteinuria está asociada sólo al grupo insulino-dependiente.(Yau et al., 2012). De igual modo, se ha confirmado que la hiperglicemia crónica es un factor crítico en la patogénesis del EMD. (Klein et al., 2010).

Existen muchos mecanismos en común detrás de las complicaciones microangiopáticas del paciente diabético incluyendo la vía de los polioles, la vía de la proteinquinasa C, la de la hexosamina y, citoquinas como el factor nuclear kB, el factor de crecimiento beta y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), etc. Todos ellos bien descritos además del mecanismo unificador de la producción de superóxido que ha sido propuesto. Sin embargo, las terapias dirigidas a estas vías no han sido del todo exitosas. Una de las razones es la falta de entendimiento fundamental de los mecanismos subyacentes. Los estudios genéticos proveen una herramienta poderosa en el entendimiento de dichos mecanismos. Estudios previos de análisis de ligamiento en familias han identificado exitosamente mutaciones responsables de patología monogenética altamente penetrante, aunque la mayoría de los loci genéticos de riesgo identificados por “Genoma-Wide Association Studies” (GWAS) para Retinopatía Diabética y Edema Macular no han sido concluyentes. (Uno de ellos en población mexicano-americana).(Chang et al., 2015). La RD es un padecimiento poligenético. La heredabilidad se ha estimado tan alta como 27% para cualquier grado de RD y hasta de 52% para la RD Proliferativa (su forma más avanzada). (Cho and Sobrin, 2014).

El único estudio realizado hasta la fecha para informar un resultado significativo en todo el genoma en la etapa de metanálisis de descubrimiento + replicación fue realizado por Burdon et al. en 2015 al combinar dos cohortes con Diabetes tipo 2 (DT2) y una cohorte con Diabetes tipo 1 (DT1) de ascendencia europea con una cohorte india con DT2. Identificaron una asociación significativa entre la RD que amenaza la vista (RDNP grave, RDP o Edema Macular) y los genotipos en **polimorfismos nucleótido-único** (SNP) rs9896052 ($P = 4,15 \times 10^{-8}$), una variante 17 kb anterior al gen GRB2 que codifica una proteína de unión al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). (Burdon et al., 2015) (Cole and Florez, 2022) Otros estudios valiosos al respecto, son el referente al **estudio de asociación pan-genómica** (GWAS) que sugiere la relación del gen NOX-4 con la RD severa en DM tipo 2 (Meng et al., 2018) y la revisión de los SNP asociados a los genes de Metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 publicada en 2022 (Gajewska and Śliwińska-Mossoń, 2022). Ver resultados resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplo de estudios recientes que reportan genes y SNPs asociados a Retinopatía Diabética.

Gen Reportado	SNP	Valor de p	Fenotipo reportado N casos/N controles	Población	Estudio	Referencia
GRB2	rs9896052	4.2x10 ⁻⁸	RD que amenaza la visión (1175 / 1319)	DM1/ DM2	Metanálisis transétnico	Burdon, et al. Diabetologia 2015
MMP-2	*rs243865	0.006	** Variable	DM2 con menos de 10 años de Dx.	Revisión	Beata Gajewska et al. Int J Mol. Sci. 2022
	rs243866	0.012				
MMP-9	*rs3918242	0.00027				
	rs17576	0.0054				
NOX-4	***rs3913535	4.05x10 ⁻⁹	RD Severa y RDP	DM2	Metanálisis de Cohortes Caucásicas	Weihua Meng et al. Acta Oftalmológica 2018
	rs10765219	7.41x10 ⁻⁸	560 / 4106			
	rs11018670	1.23x10 ⁻⁸				

*Asociados a mayor riesgo de progresión de Retinopatía Diabética.

**Referencias dentro de la Revisión: (Saravani et al., 2017; Sarray et al., 2021; Singh et al., 2013)

***En el metanálisis éste no fue significativo.

miRNAs.

En años recientes, los micro-RNAs (miRNAs) han emergido como importantes reguladores de la expresión génica en aproximadamente el 60% de los genes en humanos. Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante de 20 a 22 nucleótidos que tienen la capacidad de modular la disponibilidad de una proteína, al regular la traducción de su RNA mensajero. **(Ver Anexo 1 para la comprensión de su Biogénesis)**. Están involucrados en la regulación postranscripcional de la expresión génica a través de la degradación del RNA mensajero (RNAm) o la represión de la traducción (Chuang and Jones, 2007) (Gomaa et al., 2017), así como funciones promotoras y/o coactivadoras para otros genes. (Saliminejad et al., 2019). Se ha demostrado la participación de los miRNAs en la mayoría de los procesos biológicos, tanto normales como patológicos (Ruiz and Chakrabarti, 2013). Además, los miRNAs se pueden detectar en varios fluidos corporales, lo que los convierte en marcadores biológicos potenciales atractivos (Hirota et al., 2014; Minezaki et al., 2020; Ragusa et al., 2013).

En la última década se han llevado a cabo algunos estudios para identificar los miRNA presentes en pacientes con diferentes enfermedades oculares. (Berber et al., 2017; Guo et al.,

2017; Russo et al., 2017). En lo que a Retinopatía Diabética se refiere, la importancia de los miRNAs en regular la función de las células endoteliales y particularmente la angiogénesis fue revelada en estudios *in vitro* e *in vivo* (Caporali and Emanuelli, 2011)(Wang y Olson, 2009). El endotelio vascular es una monocapa celular que representa una barrera interna entre el torrente sanguíneo y el resto de la pared vascular. Durante la vasculogénesis (Retinopatía Diabética Proliferativa), las células endoteliales se diferencian a precursores angioblásticos, proliferan y migran para formar una red neovascular. Los factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) juegan un papel importante en este proceso. Basados en la evidencia en la literatura encontrada sobre la expresión de miRNAs y la función de las células endoteliales (CE), es posible dividir los miRNAs endoteliales en dos clases: 1.) miRNAs que codifican genes involucrados en angiogénesis (angio-miRNAs) y 2.) miRNAs cuya expresión puede ser modulada por estímulos pro-angiogénicos o anti-angiogénicos. Los primeros promueven la angiogénesis focalizándose en reguladores negativos de las vías de señalización de la angiogénesis, mientras que los segundos inhiben la angiogénesis focalizando reguladores positivos de la angiogénesis. Algunos angio-miRNAs representativos son miR-126, miR-221/222, miR-23/27, y el racimo de miR-17-92, miR-17-5, miR-20^a, miR-92a. El miRNA 15-b se ha demostrado en una relación inversa a la expresión del VEGF en la Retinopatía Diabética. (Yang et al., 2020) El MicroRNA-126 es el único miRNA el cual se considera ser expresado en las células progenitoras de las células endoteliales y hematopoyéticas. Estudios han demostrado en ratones, que la delección focalizada del miR-126 demostró un prominente rol del dicho micro RNA en el control de la integridad vascular y angiogénesis. (Mastropasqua, 2014).

Otros miRNAs involucrados en el proceso inflamatorio y/o de neovascularización y ruptura de la barrera hemato-retiniana son el miRNA-146b-3p, el mRNA200-b y el miRNA-150, entre otros. (Fulzele et al., 2015; Liu et al., 2015; McArthur et al., 2011). Estudios en pacientes diabéticos sugieren que los miRNAs pueden jugar un papel importante en el desarrollo de complicaciones asociadas a la enfermedad debido a que participan activamente en el control de los procesos inflamatorios, el metabolismo de los lípidos y la formación de vasos sanguíneos (Ruiz and Chakrabarti, 2013). La identificación de estos miRNAs puede permitir conocer los genes y rutas metabólicas que sufren modificaciones durante la progresión de la enfermedad.

Por todo lo anterior, se encuentra en fase experimental la administración tópica o intravítrea de miRNAs o anti-miRNAs en modelos animales de patología ocular. Los resultados son alentadores y, en algún momento, estos tratamientos podrían ayudar al manejo de los individuos afectados (Liu et al., 2015; Nunes et al., 2015).

Identificar los miRNAs con expresión diferencial en pacientes diabéticos, representa un eslabón en la cadena de conocimiento que se requiere para la creación de nuevas estrategias terapéuticas. están implicados en las complicaciones microvasculares inducidas por la diabetes, mientras que se encuentra que miR-146a está relacionado con todas estas complicaciones. Las publicaciones más recientes al respecto relacionan a miRNAs como miR-126, miR-29b y miR-200b con el desarrollo de la RD, mientras que otros, como el miRNA 146 parece estar involucrado con las microangiopatías diabéticas en general (Ismail et al., 2023) La tabla 2 resume los miRNAs más recientemente relacionados al desarrollo y severidad de la Retinopatía Diabética.

Tabla 2.

Función	miRNAs	Alteración	Blanco	Referencia	Año
	miR-146a-5p	Sub-expresado	HIF1- α -ROB04	(Gong et al., 2019)	2019
	miR-125b-5p	Sub-expresado	SP1/ROB04	(Gong et al., 2019)	2019
	miR-29a	Sub-expresado	FOXO4	(J. Zhang et al., 2018)	2018
	miR-29b	Sub-expresado	VASH2 VEGF	(Dantas da Costa e Silva et al., 2019)	2019
Reducción de inflamación en retina	miR-200b	Sub-expresado	VEGF PRC2	(Jiang et al., 2015) (Ruiz MA, Feng B, 2015)	2015
	miR-200c	Sub-expresado	VASH2	(Ding et al., 2017)	2017
	miR-7a	Sub-expresado	IRS-2	(Ji et al., 2021)	2021
	miR-126	Sub-expresado	VEGF, TGF β	(Pramanik et al., 2022)	2022
	miR-132	Sub-expresado	Señalización de insulina	(Pramanik et al., 2022)	2022
	miR-143-3p	Sub-expresado	HIF1- α	(Wang JH, Chuang YF, Chen J, 2022)	2022
	miR-1281	Sobre-expresado	VEGFA	(Greco et al., 2020)	2020
	miR-409-5p	Sobre-expresado	PPAR- α	(Wang et al., 2020)	2020
Aumento de la inflamación en retina	miR-139-5p	Sobre-expresado	PTEN	(Zhang et al., 2021)	2021
	miR-2116-5p	Sobre-expresado	NOTCH2	(Ji et al., 2020)	2020
	miR-3197	Sobre-expresado	NCOR2	(Ji et al., 2020)	2020
	miR-145-5p	Sobre-expresado	FGF5	(Zhang et al., 2019)	2019
	miR-181	Sobre-expresado	Kruppel-like factor 6	(Cao J, Zhao C, Gong L, 2022)	2022

El objetivo de este estudio es analizar la expresión de miRNAs en suero y vítreo de pacientes diabéticos con una microangiopatía retiniana establecida.

Justificación

No hay estudios que determinen la expresión de los miRNAs relacionados al desarrollo de Edema Macular Diabético y/o Retinopatía Diabética en pacientes mexicanos. Una vez determinada la ruta metabólica en la que dichos miRNAs ejercen una regulación, esta información podrá ser de utilidad para el futuro desarrollo de blancos terapéuticos de las complicaciones microangiopáticas de retina, altamente discapacitantes en el paciente diabético.

Esta investigación es de alto impacto para un gran número de pacientes diabéticos que en nuestra población desarrollan dichas complicaciones de manera más temprana y con mayor severidad (más que en otras poblaciones). (Angelica, 2008). Nuestra aportación sumaría a la

intención de demostrar potenciales biomarcadores para el desarrollo de la RD en mexicanos. (Villegas-Ruiz et al., 2017)

Planteamiento del problema

Las complicaciones oftalmológicas secundarias a Diabetes mellitus (DM) representan la segunda causa de discapacidad para estos pacientes, por detrás de la insuficiencia renal. La fisiopatología del EMD ha sido ampliamente estudiada y corresponde al daño estructural vascular y la ruptura de la barrera hemato-retiniana secundaria a la incompetencia y daño de los pericitos, muy similar al daño microangiopático a nivel renal. Sin embargo, no se ha estudiado si existen cambios en la expresión de miRNAs en los pacientes que lo desarrollan; esta ausencia de conocimiento dificulta el desarrollo de nuevas y más específicas opciones de tratamiento a nivel génico-molecular. El estudio de miRNAs en vítreo y suero de pacientes con EMD puede contribuir a identificar los genes involucrados en el desarrollo de esta patología, así como las vías metabólicas en las que participan. Este conocimiento puede ser la plataforma para el lanzamiento de nuevas estrategias de diagnóstico, seguimiento y manejo del EMD difuso y la RDP.

En el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) se reciben alrededor de 40 pacientes al mes con Retinopatía Diabética con o sin EMD. Este grupo de pacientes representa el 85% de la cirugía del Servicio de Retina. Esto hace del INR un centro adecuado para el estudio de esta patología.

Pregunta de Investigación

¿Cuáles miRNAs tienen una expresión diferencial en el suero y vítreo de los pacientes con Edema Macular Diabético Difuso en comparación de los pacientes con Retinopatía Diabética Proliferativa sin EMD y de pacientes metabólicamente sanos?

Objetivo General

Analizar, mediante tecnología de arreglos Taqman de baja densidad (TLDA), la expresión de miRNAs en suero y muestras de vítreo de pacientes diabéticos con Retinopatía Diabética Proliferativa Avanzada sin EMD clínico y compararlos con aquellos expresados en los pacientes cuya causa de vitrectomía sea la presencia de Edema Macular Diabético Difuso Severo, independientemente del estadio de su Retinopatía Diabética y con controles metabólicamente sanos.

Hipótesis General

Existen miRNAs en suero y vítreo de pacientes diabéticos mexicanos que tienen expresión diferencial dependiendo de la complicación micro-angiopática predominante.

Material y Métodos

Lugar y Fecha. Se invitó a participar a todo paciente del Departamento de Retina del Servicio de Oftalmología del Instituto Nacional de Rehabilitación que cumpliera con los criterios de inclusión y previa firma del Consentimiento Informado (ver detalle en **Anexo 2**) a partir del año 2017 y hasta que se completó la muestra deseada. Ver hoja de recolección de datos del paciente en **Anexo 3**. El Proyecto de Investigación fue aprobado por el Comité de Ética y Comité de Investigación del INRLGII (Ver **Anexo 4**). Para información sobre Apoyo Financiero ver **Anexo 5**.

Criterios de Inclusión.

Para pacientes diabéticos:

1.- Para el Grupo de Edema Macular Diabético (EMD):

-Pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 con **Edema Macular Diabético Difuso** sin antecedentes de tratamiento previo o con antecedente de haber sido tratado con cualquiera de las opciones terapéuticas por lo menos seis meses previos a la inclusión en el estudio (tiempo suficiente para la eliminación de cualquier medicamento intravítreo y de su efecto). -Con o sin Retinopatía Diabética Leve, Moderada, Severa o Proliferativa sin CAR (Características de Alto Riesgo, en particular la presencia de hemorragia libre en cavidad vítrea, lo cual podría representar un sesgo de muestreo por estar analizando sangre periférica y no sólo humor vítreo). Con o sin otras complicaciones microangiopáticas sistémicas.

2.- Para el Grupo de Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP):

-Pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 sin Edema Macular Diabético Clínico (focal o difuso) y **Retinopatía Diabética Proliferativa Avanzada (con indicación de vitrectomía por presencia de Desprendimiento de Retina Traccional) sin hemorragia libre en cavidad vítrea**, con o sin antecedente de fotocoagulación con láser Argón. Con o sin otras complicaciones microangiopáticas sistémicas.

Para el grupo control:

-Pacientes **no diabéticos** con diagnóstico de Membrana Epi-retiniana Idiopática que tengan indicación de tratamiento quirúrgico.

Criterios de Exclusión.

-Pacientes que no cumplan criterios de inclusión o que decidan no firmar el Consentimiento Informado.

-Pacientes con patología de retina coexistente (edema macular quístico de cualquier origen, enfermedades inflamatorias oculares, degeneración macular relacionada a la edad, retinocoroidopatía miópica, neovascularización coroidea de cualquier origen, antecedente de cirugía de segmento anterior complicada, antecedente de vitrectomía previa por cualquier causa,

antecedente de desprendimiento de retina regmatógeno y cicatrices corio-retinianas de origen inespecífico).

Tamaño de la Muestra

Se planeó la obtención de 25 pacientes por grupo. Los 8 pacientes iniciales de cada uno de ellos para el análisis de TLDAs y 17pacientes más para la validación. Tres grupos:

-Retinopatía Diabética Proliferativa Avanzada (RDP)

-Edema Macular Diabético Difuso (EMD)

-Membrana Epiretiniana (MER)

Adquisición de la Muestra de Vítreo

Previo al inicio de la vitrectomía y sin abrir la infusión de solución fisiológica, se corta y aspira con el vitrector 1 mililitro de vítreo, el cual se aspira con técnica estéril con jeringa de insulina para extraerlo de las mangueras del equipo vitrector. Se coloca en una bolsa estéril y se lleva en termo al Laboratorio del Servicio de Genética para su centrifugación y almacenaje a -80°C hasta su utilización.

Adquisición de la Muestra de Suero

Todos los pacientes que se someten a cirugía de retina son canalizados con solución salina balanceada. Antes de abrir la solución se extrajo una muestra de 5 ml en tubo amarillo de laboratorio. La muestra se centrifugó para la separación del suero. El suero fue transferido a tubos de 1.5 ml para su almacenaje a -80°C hasta su utilización.

Extracción de ARN

Los miRNAs se purificaron de 200 µl de suero vs de vítreo mediante el kit de suero miRNeasy (QIAGEN, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el RNA con un NanoDrop (Thermo Scientific). Por lo general, el rendimiento fue de 20-50 ng/µL en suero, mostrando un rendimiento menor en vítreo.

El procedimiento de la extracción de RNA total fue como sigue:

1. Se tomó 200 µl de suero en un tubo de 1.5 ml.
2. Se adicionó 750 µl de TRIzol LS Reagent y mezclar con vórtex.
3. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se adicionó 200 µl de cloroformo y se mezcló por inversión durante 15 segundos.
5. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
7. Se recuperó la fase acuosa en un tubo de 1.5 ml nuevo (~600 µl).
8. Se adicionó 1.5 volúmenes de Isopropanol al 100% (~900 µl).
9. Se mezcló tubos por inversión.
10. Se incubó a temperatura de -20°C durante 20 minutos.
11. Se agregó 700 µl a una columna de purificación.

12. Se centrifugó a 12,500 rpm durante 1 minuto.
13. Se descartó el filtrado.
14. Se repitieron los pasos 12 y 13, hasta pasar toda la muestra.
15. Se lavó con 700 μ l de buffer RWT, y centrifugó a 12,500 rpm 1 minuto.
16. Se lavó con 500 μ l de buffer RPE, y se centrifugó a 12,500 rpm 1 minuto.
17. Se lavó con 500 μ l de EtOH 75%, y centrifugó a 12,500 rpm 1 minuto.
18. Se colocaron las columnas en tubos de colección limpios y se centrifugó durante 3 minutos a 12,500 rpm con la tapa abierta.
19. Se colocaron las columnas en tubos de colección limpios (tubos de 1.5 ml).
20. Se adicionó 20 μ l de H₂O (se precalentó a 42°C) en el centro de la columna.
21. Se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,500 rpm.
22. Se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Inc.).
23. Se almacenó a temperatura de -70°C hasta su utilización.

Perfiles de microRNAs (miRNAs)

La cuantificación global de miRNAs en suero, se realizó mediante los arreglos TaqMan de baja densidad v2.0 (TLDA, Applied Biosystems), los cuales incluyen dos placas (A y B). La placa A contiene 384 sondas TaqMan de miRNAs conocidos, permitiendo la cuantificación simultánea de 377 miRNAs maduros humanos y 4 controles endógenos. La placa B, contiene 290 sondas TaqMan de miRNAs maduros humanos y 7 para controles endógenos.

Cuando se completaron 15 pacientes por grupo, se incluyeron 8 muestras de cada uno para cada pool por grupo, por lo que se prepararon 6 pools de RNA total: Los tres grupos (Retinopatía Diabética, Edema Macular Diabético y Membrana Epi-retiniana) en suero y los mismos tres grupos en vítreo. Se tomaron 3 μ l de RNA de cada pool, para posteriormente hacer la transcripción reversa y la síntesis de cDNA utilizando primers Megaplex RT de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante Applied Biosystems. Las reacciones se mezclaron por inversión y se centrifugaron. Se tomó 4.5 μ l de cada mezcla (A y B) en 4 tubos para PCR (8 tubos en total) y finalmente se agregaron 3 μ l de RNA (30ng).

Posteriormente, los productos de RT Megaplex fueron pre-amplificados usando primers PreAmp Megaplex y el Master Mix preamplificador TaqMan (Applied Biosystems). Las reacciones se mezclaron por inversión y se centrifugaron, se tomó 22.5 μ l de cada mezcla (A y B) en 4 tubos para PCR (8 tubos en total). Se agregó 2.5 μ l del producto de RT y se agregó 75 μ l de agua a cada tubo. El resto de las reacciones se almacenaron a -20°C.

Una vez obtenido el cDNA pre-amplificado, este fue diluido con agua destilada en una proporción 1:8 para posteriormente distribuirse en los 384 pozos por centrifugación según instrucciones del fabricante. Los parámetros de la qPCR fueron 95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 s y a 60 °C durante 1 minuto. Los TLDA fueron analizados con el Software QuantStudio 7 (Applied Biosystems) para determinar el valor de CT. Se utilizó el Software Expression Suite para el análisis estadístico. Sólo los miRNAs con un valor de Ct menor a 35 fueron considerados para el análisis de expresión. Se calculó las veces de cambio (FC, fold change) y se registraron las P significativas. Se utilizó el valor de la expresión media global de todos los miRNAs como el factor de normalización.

Validación por PCR-Tiempo real

Para la validación de los resultados, algunos de los miRNAs diferencialmente expresados fueron analizados en reacciones por triplicado utilizando los ensayos prediseñados TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies). La validación de los miRNAs expresados diferencialmente se realizó en cada una de las muestras de los 6 grupos de estudio. Los resultados se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Resultados.

Datos clínicos. Se recolectaron con éxito muestras de 17 pacientes con EMD, 16 pacientes con RDP y 23 pacientes con MER. Las edades medias fueron significativamente diferentes entre los grupos ($p < 0.001$), siendo mayores los del grupo de MER y menores los del grupo de RDP (Tabla 1). El sexo predominante en los tres grupos fue el femenino, aunque la diferencia de proporciones no es significativa ($p = 0,614$). La media de los años desde el diagnóstico de DM fue mayor en el grupo EMD en comparación con el grupo RDP ($p = 0.003$). La mejor agudeza visual corregida media (AVMC) fue menor en el grupo EMD (transformada logarítmicamente en la Tabla 1) sin significancia frente a los controles, pero, al comparar ambos grupos de diabéticos, los pacientes con EMD tienen una visión significativamente menor que los pacientes con RDP ($p < 0.001$). Alrededor del 27 % de los pacientes diabéticos habían sido tratados con un anti-VEGF más de 12 meses antes de su participación en el estudio. La media preoperatoria de glucemia es mayor en el grupo de EMD ($p = 0.010$). Solo un paciente en el grupo de RDP y dos en el grupo de EMD tenían nefropatía diabética. No se informaron otras complicaciones relacionadas con la DM en el estudio de población. Respecto al grupo control formado por individuos con MER, en todos ellos se descartó la presencia de Diabetes Mellitus. La edad media del grupo de MER fue significativamente mayor que la de los pacientes diabéticos; esto está relacionado con la edad habitual de presentación de la MER idiopática. La agudeza visual promedio en este grupo fue de 0.7 en logMAR, que es aproximadamente 20/100 en la tabla de Snellen (Tabla 3).

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los grupos estudiados.

	Grupos de Estudio			Valor de p
	RDP (n = 16)	EMD (n = 17)	MER (n = 23)	
Edad, media (DE)	55.65 (10.74)	64.25 (9.48)	77.69 (8.42)	^a $p < 0.001$
Sexo				
Masculino n (%)	4 (25)	7 (41)	8 (35)	^b $p = 0.614$
Femenino n (%)	12 (75)	10 (59)	15 (65)	
Años desde el diagnóstico de DM, media (DE)	16.3 (8.51)	21.26 (10.56)	n/A	^c $p = 0.003$
AVMC, media logMAR * (DE)	1.0 (0.35)	1.5 (0.27)	0.7 (0.25)	^a $p < 0.001$ ^d $p = 0.173$ ^e $p = 0.064$ ^f $p < 0.001$
Tratamiento Anti-VEGF previo n (%)	3 (18.75)	6 (35.29)	n/A	^c $p = 0.286$
Glicemia (mg/dl), media (DE)	114.25 (45.15)	121.16 (41.95)	96.08 (16.66)	^a $p = 0.071$ ^d $p = 0.0032$ ^e $p = 0.0022$ ^f $p = 0.010$
Complicaciones relacionadas a DM				
Nefropatía Diabética n (%)	1 (6.25%)	2 (11.76%)	n/A	^f $p = 0.581$

RDP: retinopatía diabética proliferativa, EMD: edema macular diabético, MER: membrana epi-retiniana idiopática, DM: diabetes mellitus, AVMC: agudeza visual mejor corregida, DE: desviación estándar, VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial. La edad se expresa en años. Valor de ^ap derivado de ANOVA comparando los tres grupos. Valor de ^bp para comparación de proporciones a través de una prueba de chi-cuadrado. Valor de ^cp obtenido a través de una prueba t que compara los grupos RDP vs. EMD. Valor de ^dp de la comparación de RDP vs. MER. Valor ^ep de la comparación de EMD vs. MER. Valor ^fp de la comparación RDP vs. EMD. *logMAR (logaritmo del ángulo mínimo de resolución, es un logaritmo en base 10 para permitir una estimación más precisa de la agudeza visual).

Análisis de expresión de miRNAs. TLDA.

Los resultados de las placas fueron analizados utilizando el Software Quant Studio 7 (Applied Biosystems). En este primer análisis se asignó el valor de CT que mejor se ajustaba a los resultados (en la fase exponencial de las curvas de amplificación sin tomar en cuenta el ruido). Se utilizó el mismo CT para el análisis de todas las placas realizadas. Posteriormente, para identificar los miRNAs con expresión diferencial entre los grupos estudiados, se realizó la prueba de t de student utilizando el software Expression Suite v1.0.3 (Life Technologies). Aquellos miRNAs con un valor de $p < 0.05$ y una razón de cambio > 1.5 o < 0.05 se consideraron como diferencialmente expresados. Se optó por una estrategia de normalización global para todas las placas analizadas.

El análisis de expresión a través de TLDA de cada grupo de estudio se realizó por duplicado. Cuando comparamos los perfiles de expresión de pacientes con RDP frente a MER, tres miRNAs mostraron expresión diferencial en suero, hsa-miR-320a-3p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-375-3p, y dos lo hicieron en las muestras de vítreo, hsa-miR-541-5p y hsa-miR-223-5p. Cuando la comparación fue entre pacientes con EMD contra MER, cuatro miRNAs tenían una expresión diferencial significativa; en suero, estos fueron: hsa-miR-486-5p, hsa-miR-197-3p y hsa-miR-125b-5p, mientras que en las muestras de vítreo: hsa-miR-212-3p. En la comparación entre ambos grupos de pacientes diabéticos (RDP vs EMD, considerando al EMD como referencia), se expresaron diferencialmente en suero cinco miRNAs: hsa-miR-486-3p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-328-3p, hsa-660-5p y hsa-145-5p. En las muestras vítreas, la comparación entre estos dos grupos no mostró a ningún miRNA de manera diferencial. La Tabla 4 resume estos hallazgos.

Tabla 4. miRNAs expresados diferencialmente en las muestras de suero y vítreo, obtenidos mediante TLDA.

	RDP vs. MER			EMD vs. MER			RDP vs. EMD		
	hsa-miR	Valor de <i>p</i>	FC	hsa-miR	Valor de <i>p</i>	FC	hsa-miR	Valor de <i>p</i>	FC
Suero	375-3p	0.004	2.84	486-5p	0.018	0.382	486-3p	0.018	0.382
	320a-3p	0.021	0.687	197-3p	0.014	0.533	100-5p	0.033	0.41
	92a-3p	0.0029	0.934	125b-5p	0.019	0.112	328-3p	0.038	0.481
							660-5p	0.039	2.719
						145-5p	0.010	2.72	
Vítreo	223-5p	0.016	0.360	212-3p	0.005	6.412			
	541-5p	0.016	0.390						

En negrita: miARNs seleccionados para su validación mediante qPCR. En la comparación de RDP vs EMD, el EMD fue considerado el grupo de referencia. RDP: retinopatía diabética proliferativa, EMD: edema macular diabético, MER: membrana epi-retiniana idiopática, FC: veces de cambio (fold change).

Identificación de genes diana y análisis de enriquecimiento.

Un total de 14 miRNAs mostraron expresión diferencial en el ensayo de TLDAs. Para identificar aún más las funciones enriquecidas bajo la regulación de los miRNAs expresados diferencialmente, utilizamos los genes blanco como entrada para el análisis de enriquecimiento. El análisis con miRNet reveló 1911 genes diana conocidos, con elementos de respuesta del miRNA en su región 3'UTR, para los cinco miRNAs que se expresaron de manera diferencial en la comparación de RDP frente a MER. Para los cuatro miRNAs con expresión diferencial al comparar EMD frente a MER, se identificaron 1417 genes diana. Estos se utilizaron como entrada para el análisis de enriquecimiento. La Tabla 5 muestra las rutas enriquecidas de cada comparación. Para ambas comparaciones, el análisis de ontología de genes mostró que la mayoría de los genes diana participan en la regulación biológica, se expresan en el núcleo y tienen una función relacionada con la unión a proteínas (Figura 4).

Tabla 5. Rutas enriquecidas basadas en los genes diana bajo la regulación de miRNAs con expresión diferencial, encontrados a través del análisis de TLDAs.

Descripción	Rate	Valor de <i>p</i>	FDR
RDP vs. MER			
Ciclo Celular	2.087	1.008E-11	3.287E-09
Uniones adherentes	2.272	1.949E-09	1.059E-07
Vía de señalización AGE-RAGE en complicaciones diabéticas	1.883	5.621E-07	1.078E-05
Resistencia al inhibidor de la tirosina cinasa del EGFR	1.926	2.952E-06	4.375E-05
Adhesión focal	1.530	9.972E-06	1.161E-04
Vía de señalización de ErbB	1.835	1.055E-05	1.186E-04
Vía de señalización de TGF-beta	1.767	5.141E-05	5.079E-04
Vía de señalización de AMPK	1.617	7.505E-05	6.796E-04
Vía de señalización de HIF-1	1.636	1.962E-04	1.330E-03
Uniones estrechas	1.477	1.999E-04	1.330E-03
EMD vs. MER			
Ciclo celular	2.5656	1.421E-14	2.316E-12
Vía de señalización de TGF-beta	2.3213	6.262E-08	2.807E-06
Vía de señalización AGE-RAGE en complicaciones diabéticas	2.1251	3.783E-07	9.487E-06
Resistencia al inhibidor de la tirosina cinasa del EGFR	2.2084	1.295E-06	2.380E-05
Vía de señalización de HIF-1	2.0525	1.533E-06	2.380E-05
Vía de señalización de AMPK	1.7959	4.239E-05	3.735E-04
Resistencia Endócrina	1.8326	1.138E-04	8.631E-04
Vía de señalización de ErbB	1.8714	1.781E-04	1.290E-03
Uniones adherentes	1.9242	2.713E-04	1.805E-03
Vía de señalización del TNF	1.726	2.987E-04	0.0019

FDR, false Discovery rate. RDP, retinopatía diabética proliferativa. MER, membrana epi-retiniana idiopática. EMD, edema macular diabético.

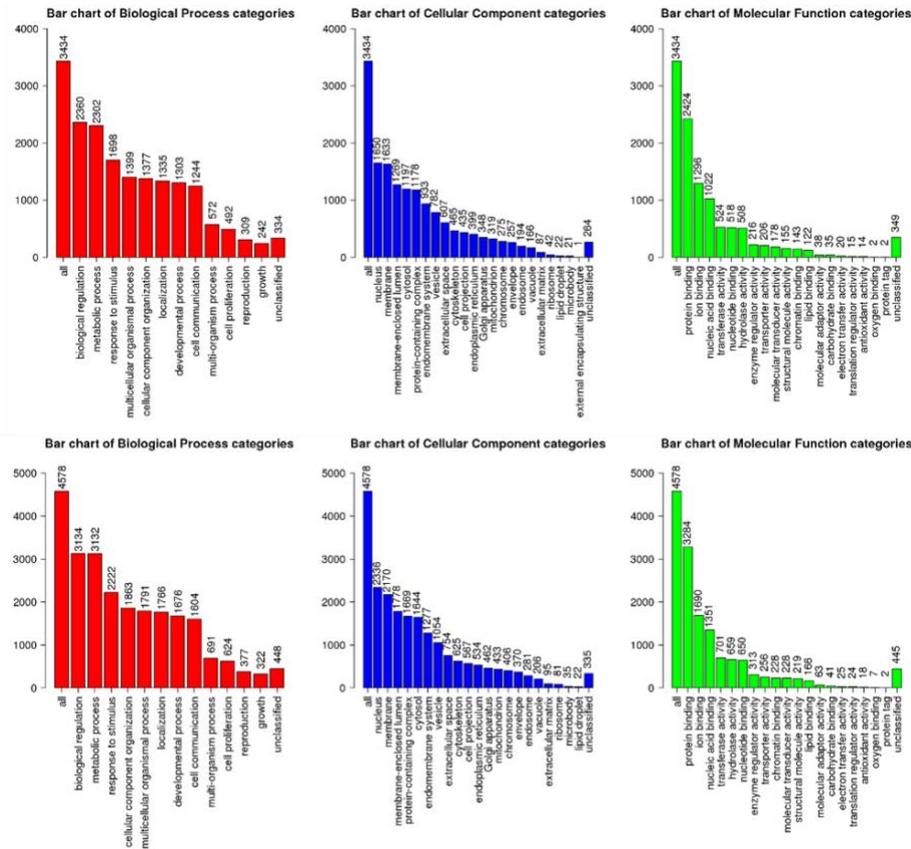


Figura 4. Análisis de ontología génica de los genes diana bajo la regulación de los miRNAs que mostraron expresión diferencial en el ensayo TLDAs. Arriba: comparación de la retinopatía diabética proliferativa frente a la membrana epi-retiniana idiopática. Abajo: comparación del edema macular diabético frente a la membrana epi-retiniana idiopática. Categorías de procesos biológicos en rojo, categorías de componente celular en azul y categorías de función molecular en verde.

qPCR Validación de miRNAs.

Realizamos una revisión de la literatura enfocada en aquellos miRNAs que muestran expresión diferencial en el análisis de TLDAs. Con base en la evidencia previa informada, (Zhang et al., 2019) (Bonauer et al., 2009; Wang et al., 2019), (An et al., 2020) (Wu et al., 2012; Xiong et al., 2014) (Sun et al., 2018), cuatro miRNAs en el suero, hsa-miR-145, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-486-5p y hsa-miR-375-3p, y dos en las muestras vítreas, hsa-miR-223-5p y hsa-miR-212-3p, fueron seleccionados para su posterior validación a través de qPCR. Se realizaron ensayos de validación en todos los individuos de cada grupo de estudio. El análisis de los cuatro miRNAs en suero validó la expresión diferencial en tres de ellos, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-145, entre los grupos de estudio. Un análisis posterior reveló diferencias significativas entre algunos de los pares de grupos (Figura 5).

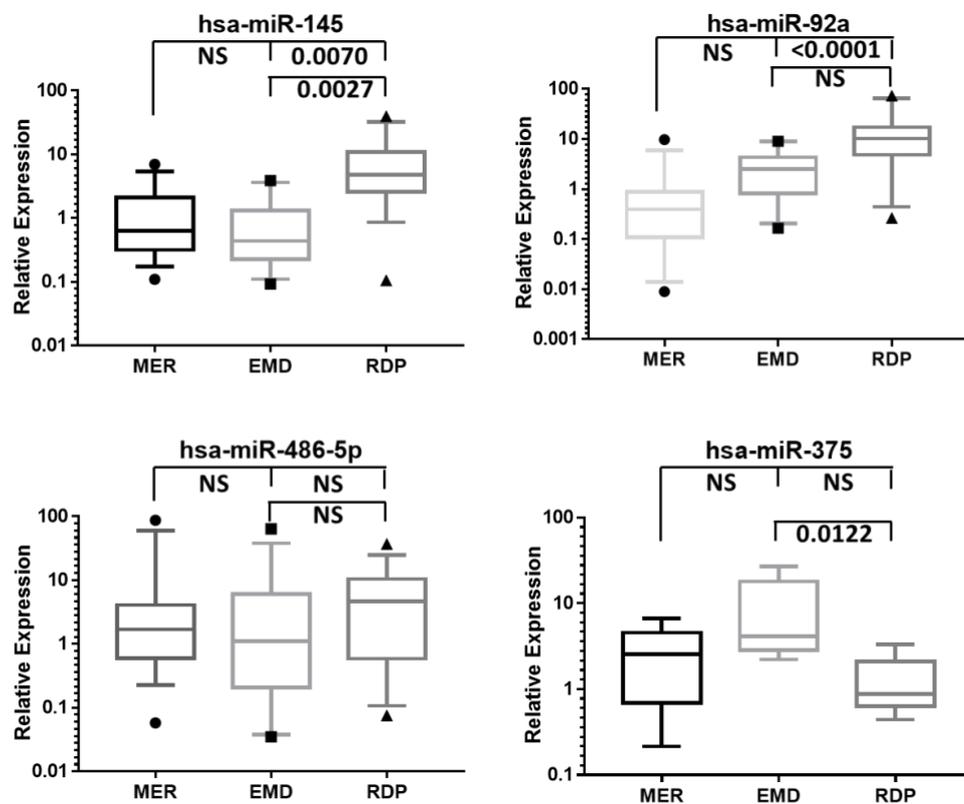


Figura 5. Expresión relativa de los cuatro miRNAs validados en suero. Cuatro miRNAs fueron validados en todos los participantes de los tres grupos de estudio. Se muestran los valores de p de las comparaciones por pares (NS, no es un valor de p significativo). El gráfico presenta medianas con un rango intercuartílico. MER, membrana epi-retiniana idiopática. EMD, edema macular diabético. RDP, retinopatía diabética proliferativa.

De modo interesante, no hubo diferencias significativas entre los grupos de MER y EMD. Por otro lado, la expresión de hsa-miR-145 y hsa-miR-92a-3p fue significativamente mayor en el grupo de RDP en comparación con el grupo de MER. El único miRNA con expresión diferencial entre los dos grupos de diabéticos fue hsa-miR-375-3p, que mostró una mayor expresión en el grupo EMD en comparación con el grupo de RDP. También realizamos la validación de qPCR en dos miRNAs de las muestras vítreas, hsa-miR-212-3p y hsa-miR-223-5p. Estos dos no se pudieron detectar en la mayoría de las muestras de los tres grupos, incluso cuando el gen de referencia se amplificó correctamente. Por lo tanto, no pudimos validar estos dos miRNAs. El análisis de correlación entre los tres miRNAs validados y los niveles de glucemia, el número de años desde el diagnóstico de DM2 y la AVMC no reveló correlaciones estadísticamente significativas (datos no mostrados).

Análisis de enriquecimiento.

Los genes diana de los tres miRNAs validados se obtuvieron utilizando la base de datos miRNet. Se reconocieron un total de 1326 genes blanco. Estos genes se usaron como entrada para el análisis de enriquecimiento funcional en gProfiler para buscar en las bases de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), Reactome y Wikipathways. Posteriormente, las redes de interacción de las vías se construyeron utilizando la aplicación Enrichment Map para Cytoscape. Reactome y Wikipathways revelaron un enriquecimiento de las vías relacionadas con VEGF y también se identificaron las vías de interacción más cercanas (Figura 6). La vía metabólica relacionada a la Adhesión Focal también mostró enriquecimiento en dos bases de datos, Wikipathways y KEGG.

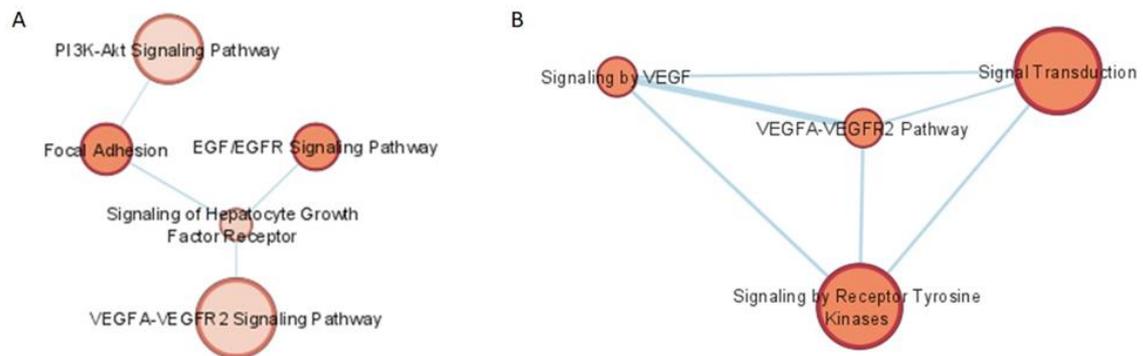


Figura 6. Interacción de vías enriquecidas. Los genes diana de los tres miRNAs validados con expresión diferencial en el suero se utilizaron como entrada para el análisis de enriquecimiento en las bases de datos KEGG, Reactome y Wikipathways. Las vías relacionadas con VEGF se enriquecieron en Wikipathways (A) y Reactome (B).

Discusión.

En lo que respecta a las complicaciones microvasculares, se ha reconocido que los estudios genéticos son herramientas poderosas para develar el mecanismo molecular de la enfermedad. Se ha demostrado que, una variedad de genes está involucrada en el desarrollo y la progresión de la retinopatía diabética (Chang et al., 2015). Por otro lado, se ha estimado que la heredabilidad llega al 27 % para cualquier retinopatía diabética y al 52 % para la RDP (Cho and Sobrin, 2014). Existe una gran cantidad de evidencia sobre el papel diverso de los miRNAs en muchos procesos biológicos, incluidas la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y el desarrollo. El conocimiento de las rutas metabólicas relacionadas con la DM en las que se ha implicado la disregulación de los miRNAs está en constante crecimiento (Kantharidis et al., 2011), y es interesante la observación de que algunos miRNAs comparten acción sobre la microangiopatía diabética multisistémica, como lo demuestran los miR-200a/b /c (Ruiz and Chakrabarti, 2013). La importancia de los miRNAs en la regulación de la función de las células endoteliales y particularmente de la angiogénesis fue revelada por estudios *in vitro* e *in vivo*. Zhang et al, revisaron y compilaron con éxito el conocimiento publicado sobre el papel de los miRNAs involucrados en la diabetes y la disfunción vascular inducida. Uno de los más destacados es el miR-200b, que ha demostrado tener un papel importante en la regulación de la retinopatía diabética mediada por VEGF (McArthur et al., 2011; Y. Zhang et al., 2018). Otro de gran interés es el miR-126, que ha sido reportado como protector frente a la neovascularización inducida por hipoxia con efecto inhibitor de la expresión de VEGF. Varios estudios en todo el mundo demuestran la expresión descendente de miR-126 en presencia de PDR (Barutta et al., 2016; Sabbah and Saad, 2016; Ye et al., 2013). Si bien estos últimos no se expresaron diferencialmente en el presente estudio, los que sí lo hicieron tienen un vínculo fundamental en la fisiopatología de la vasculopatía diabética según lo registrado en los bancos de información que relacionan a los miRNAs con sus vías metabólicas. Entre los miRNAs implicados en la modulación de vías cruciales para el metabolismo de la glucosa, el miR-375 se expresa en gran medida en las células β pancreáticas. Está demostrado ser capaz de reducir directamente la secreción de insulina (Mastropasqua et al., 2014; Poy et al., 2004). Se encontró que los niveles de miR-375 estaban relacionados con el daño a la adherencia de la zónula y la zonula ocludens, lo cual está estrechamente relacionado con la ruptura de la barrera hemato-retiniana. Más específicamente, miR-375, que se encontró regulado al alza en el suero de pacientes con PDR en el presente estudio, se ha encontrado expresado de manera diferencial en el tejido retiniano de ratas diabéticas frente a controles (Wu et al., 2012). También se ha descrito que regula la actividad de las células endoteliales microvasculares pulmonares de rata durante la hipoxia al dirigirse a Notch1 (An et al., 2020). Este último representa una vía crucial que regula la angiogénesis del desarrollo en la retinopatía diabética (Miloudi et al., 2019).

En ratas diabéticas, miR-320 reguló negativamente el aumento de VEGF inducido por glucosa (Feng and Chakrabarti, 2012). Dado lo anterior, no es de extrañar que la encontremos expresada a la baja en el suero de pacientes con RDP, aunque no fue validada con éxito por qPCR. Estos hallazgos se correlacionan con otro estudio que demuestra la expresión diferencial significativa de varios miRNAs relacionados con la angiogénesis y la fibrosis, presentes en el vítreo (miR-15a, miR320a, miR-320b, miR-93, miR-29a y miR- 423-5p), y en el suero (miR-23a, miR-320a y miR-320b) de pacientes con RDP, frente al vítreo y suero de pacientes con agujero macular, estos últimos utilizados como controles sanos (Hirota et al., 2014). Por otro lado, Zampetaki y cols, identificaron miR-320 y miR-27b como posibles

biomarcadores predictores de la progresión de la retinopatía en pacientes con DM tipo 1 (Zampetaki et al., 2016a). Es de hacer notar que miR-320 y miR-125b se han relacionado con daño endotelial (Silambarasan et al., 2016), dirigidos a vías metabólicas inflamatorias, totalmente consistentes con nuestros hallazgos. Otro miARN que encontramos digno de representación de lo descrito previamente por otros autores y que encontramos expresado a la baja en pacientes con RDP fue el miR-92a-3p. Éste se ha descrito como inhibidor del estrés oxidativo (Y. Zhang et al., 2018) y predictor de síndrome coronario agudo en diabéticos (Wang et al., 2019). También se ha reconocido como parte de los miARN endógenos que regulan los genes implicados en la hipertensión en las células endoteliales. (Kriegel et al., 2015). Este miARN tiene como diana el ARNm de Nox4 (el silenciamiento del mismo, lo cual concuerda con su expresión a la baja), que a su vez, se ha demostrado que su delección reduce el estrés oxidativo y la lesión en la nefropatía diabética. (Thallas-Bonke et al., 2014).

La familia hsa-miR-92a se ha descrito como uno de los miembros del grupo de miRNAs reguladores de la angiogénesis. (Caporali and Emanuelli, 2011) . Bonauer y cols demostraron que el miR-92a controla el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y su sobreexpresión en las células endoteliales bloquea la angiogénesis in vitro e in vivo. (Bonauer et al., 2009).

El miR-92a inhibe la angiogénesis al dirigirse a VEGFA y la subunidad alfa5 de la integrina. (Sun et al., 2018). Nuestros hallazgos revelaron una regulación a la baja de hsa-miR-92a, según sus efectos descritos, podría ser parte de los mecanismos moleculares que promueven la neovascularización de la retina en pacientes con retinopatía diabética proliferativa. Se ha demostrado que la inhibición de has-miR-92a desencadena el crecimiento de vasos en ratones. Aunque hsa-miR-92a parece un recurso terapéutico potencial, es importante considerar que incluso al inducir su expresión para inhibir la vascularización en la retina, podría haber efectos fuera del objetivo en otros tejidos. Ese es uno de los grandes retos de la ciencia a considerar cuando hablamos de miRNAs como potenciales blancos terapéuticos.

La permeabilidad vascular es una característica fundamental de la inflamación y puede conducir a microangiopatías retinianas diabéticas y daño a la matriz mesangial en el riñón. En el análisis de enriquecimiento, las vías metabólicas que se encuentran vinculadas con los miRNAs regulados a la alza o baja en el presente estudio, están relacionadas con la apoptosis, la adhesión focal, las zónulas adherentes y las uniones celulares estrechas; todas ellas involucradas en la pérdida de pericitos, que representa el factor más importante desencadenante de las características clínicas de la RD (Joglekar et al., 2016; Sarai et al., 2009; Zampetaki et al., 2016b). Algunos otros miRNAs ya descritos están involucrados en la inflamación y/o neovascularización y ruptura de la barrera hematorretiniana: el miRNA-146b-3p, el miRNA200-b y el miRNA-150, entre otros. (Fulzele et al., 2015; Liu et al., 2018; McArthur et al., 2011).

Cabe señalar que, aunque la RD y el EMD comparten fisiopatología, por ser ambas complicaciones microvasculares de la retina, los hallazgos descritos anteriormente sólo se demuestran en la RD y no específicamente en el EMD. Hasta donde sabemos, es el primer estudio que informa la expresión diferencial de miRNAs en suero de pacientes con edema macular diabético.

Las vías enriquecidas que consideran los genes diana bajo la regulación de los miRNAs expresados diferencialmente incluyen, en el presente estudio, vías de señalización diferentes, pero estrechamente relacionadas, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su

receptor (HGFR), el factor de crecimiento epidérmico (EGF y EGFR), P13K-Akt, Receptor de Tirosina Quinasa (RTKs) y evidentemente, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGFA y VEGFR). HGF es una citoquina multifunción que juega un papel importante en la fisiología pancreática. Hablando de microangiopatías diabéticas en la retina, J-H Yun descubrió que el HGF participa en la supervivencia de los pericitos al aumentar la vía de señalización de Akt y fortalecer la unión estrecha endotelial. (Yun, 2021). En contraparte, Lorenc y cols informaron que los niveles acuosos de HGF se correlacionan con la gravedad del edema y también aumentó en células y macrófagos asociados con la neovascularización retiniana en el modelo de retina isquémica de ratones. (Lorenc et al., 2020). Nosotros encontramos una relación entre DR y esta vía de señalización, pero aún no podemos saber si se activa a favor o en contra de la progresión de la microangiopatía de la retina. Varios receptores de tirosina quinasa (RTK) han sido involucrados en la angiogénesis, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR). El primero ha sido propuesto como biomarcador de RD. (Tayyari et al., 2019). You y cols han proporcionado conocimiento al respecto, mostrando que el vítreo normal tiene la capacidad de promover el crecimiento de las células epiteliales y endoteliales de la retina humana a través de la vía de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K)/Akt (Han et al., 2019; You et al., 2020). Este último se ha relacionado con la migración, proliferación y disfunción de la angiogénesis inducida por hiperglucemia de las células endoteliales en pacientes con diabetes y representa una vía de señalización celular que regula el crecimiento.

Los autores mencionados también demostraron que el propio humor vítreo aumenta la proliferación, la migración y la formación de tubos vasculares a través de EGFR en las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Por otro lado, el hallazgo de que la supresión de la activación de Akt inducida por el vítreo y la proliferación y migración celular por el bloqueo de este receptor (EGFR) en cultivos celulares, exalta la importancia del vítreo en la patobiología ocular de las enfermedades oftálmicas relacionadas con la angiogénesis. (You et al., 2020). En relación con estos hallazgos, está el que la familia EGFR de RTK está involucrada en la angiopatía diabética multisistémica. (Ju et al., 2019; Majumder et al., 2019; Shraim et al., 2021).

Finalmente, no podemos hablar de RD dejando de lado la permeabilidad de la barrera hematorretiniana (BHR) y la importancia de las adherencias focales entre pericitos y células endoteliales (EC-FAs) como principales componentes estructurales. Las adherencias focales (AF) están compuestas por una alta densidad de proteínas y proporcionan enlaces dinámicos entre la matriz extracelular y el citoesqueleto intracelular. La quinasa de adhesión focal (FAK) o vinculina es una proteína tirosina quinasa no receptora. Se encuentra principalmente en las AF y es una molécula clave implicada en el control de la migración de pericitos, la cual representa uno de los mecanismos demostrados de pérdida de estos en la retina diabética. La migración de pericitos promueve el aumento de la permeabilidad vascular y la fuga de la BHR, lo cual es una característica temprana de la retinopatía diabética. (Lin et al., 2018).

Interesante es, que algunos de los miRNAs más reportados en la literatura asociados con nuestra patología de interés no mostraron expresión diferencial en nuestros resultados; otras coinciden plenamente, y algunas otras, con expresión significativa en nuestro estudio, están siendo descritas por primera vez en asociación con la microangiopatía retiniana. Hasta donde sabemos, este es el primer análisis de la expresión de miRNAs en vítreo y suero que busca diferencias dentro de dos manifestaciones diferentes de la microangiopatía diabética de la retina. Nuestros resultados apoyan un papel potencial de los miRNAs en la patogenia de ambos, aun cuando aún queda mucho por saber sobre los mecanismos por los que cada

paciente se ve afectado de forma preferencial. Estos hallazgos proporcionan un conocimiento valioso para comprender los procesos moleculares que subyacen a las complicaciones oftalmológicas de la Diabetes Mellitus.

Este estudio, sin duda, tiene algunas limitaciones. En primer lugar, el tamaño de la muestra, el cual podría parecer relativamente pequeño. Sin embargo, pudimos demostrar que los miRNAs aquí validados, regulan genes diana que participan en vías relacionadas con la fisiopatología de las microangiopatías diabéticas. En segundo lugar, no pudimos validar los miRNAs presentes en el vítreo, una posible razón podría estar relacionada con la cantidad de RNA total obtenida de muestras tan pequeñas ó, el tamaño de la muestra en sí. Es probable que un tamaño de muestra más grande pudiera superar la falta de detección de estos miRNAs. Sin embargo, esta evidencia podría ser evaluada por diferentes grupos de investigación para confirmar o descartar nuestros hallazgos.

Conclusiones.

- Incluso cuando el en el presente trabajo algunos de los miRNAs más reportados en la literatura asociados con el desarrollo y/o severidad de la microangiopatía diabética de retina, no mostraron expresión diferencial; otras, con expresión significativa en nuestro estudio, están siendo descritas por primera vez.
- Tres miRNAs en suero se expresaron de modo significativo y diferencial en el grupo de RDP en comparación con el grupo control, hsa-miR-320a-3p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-375-3p, y dos lo hicieron en las muestras de vítreo, hsa-miR-541-5p y hsa-miR-223-5p.
- El único miRNA con expresión diferencial entre los dos grupos de diabéticos fue hsa-miR-375-3p, que mostró una mayor expresión en el grupo EMD en comparación con el grupo de RDP.
- Ningún miRNA expresado de modo diferencial en vítreo obtuvo el mismo resultado durante su validación por q-PCR.
- Utilizando software especializado para el análisis de enriquecimiento, las principales vías metabólicas relacionadas a los miRNAs descritos, son aquellas relacionadas con el factor de crecimiento vascular endotelial VEGFA y su receptor (VEGFR), el factor de crecimiento de hepatocitos HGF y su receptor (HGFR), el factor de crecimiento epidérmico (EGF y EGFR), P13K-Akt, el Receptor de Tirosina Quinasa (RTKs), la vía de señalización AGE-RAGE y de Adhesión Focal, entre otras. Todas ellas relacionadas al desarrollo y severidad de la microangiopatía diabética.

Perspectivas.

Para los autores, el presente estudio abre ventanas importantes de conocimiento a seguir explorando. En el futuro inmediato debemos abordar las preguntas de investigación que refuercen los puntos débiles y las limitaciones de la investigación realizada:

Revalorar la metodología en el manejo de las muestras de vítreo de tal forma que puedan ser útiles, a pesar de la escasa cantidad de las mismas y plantear interrogantes sobre la incapacidad del método utilizado para validar los resultados en ellas.

Continuar en el esfuerzo de ampliar el tamaño de la muestra que nos permitan elevar la potencia en los resultados descritos.

Un estudio de secuenciación permitiría la descripción de nuevos miRNAs involucrados, sin la limitante de los ya contenidos en los TLDAs.

La validación de los miRNAs destacados en el presente estudio por otros grupos de investigadores en el mismo grupo etario (mexicanos), sería una gran aportación, así como la elección del más representativo de ellos y su detección masiva en el grupo de interés versus controles sanos para determinar su posible uso a modo de biomarcador capaz de predecir el progreso y severidad de la patología y/o ser útil como potencial blanco terapéutico.

Referencias.

- An, Y., Liu, Z., Ding, H., Lv, Q., Fan, H., Hou, S., Cai, W., Liu, S., 2020. MiR-375-3p regulates rat pulmonary microvascular endothelial cell activity by targeting Notch1 during hypoxia. *Journal of International Medical Research* 48. <https://doi.org/10.1177/0300060520926851>
- Angelica, M.D., Fong, Y., 2008. NIH Public Access. October 141, 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>.Use
- Barutta, F., Bruno, G., Matullo, G., Chaturvedi, N., Grimaldi, S., Schalkwijk, C., Stehouwer, C.D., Fuller, J.H., 2016. MicroRNA-126 and micro- / macrovascular complications of type 1 diabetes in the EURODIAB Prospective Complications Study. *Acta Diabetol.* <https://doi.org/10.1007/s00592-016-0915-4>
- Berber, P., Grassmann, F., Kiel, C., Weber, B.H.F., 2017. An Eye on Age-Related Macular Degeneration: The Role of MicroRNAs in Disease Pathology. *Mol Diagn Ther.* <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0234-z>
- Berrocal, M.H., Acaba, L.A., Acaba, A., 2016. Surgery for Diabetic Eye Complications. *Curr Diab Rep* 16, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0787-6>
- Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A., Burchfield, J., Fox, H., Doebele, C., Ohtani, K., Chavakis, E., Potente, M., Tjwa, M., Urbich, C., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2009. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in Mice. *Science (1979)* 324, 1710–1713. <https://doi.org/10.1126/science.1174381>
- Burdon, K.P., Fogarty, R.D., Shen, W., Abhary, S., Kaidonis, G., Appukuttan, B., Hewitt, A.W., Sharma, S., Daniell, M., Essex, R.W., Chang, J.H., Klebe, S., Lake, S.R., Pal, B., Jenkins, A., Govindarjan, G., Sundaresan, P., Lamoureux, E.L., Ramasamy, K., Pefkianaki, M., Hykin, P.G., Petrovsky, N., Brown, M.A., Gillies, M.C., Craig, J.E., 2015. Genome-wide association study for sight-threatening diabetic retinopathy reveals association with genetic variation near the GRB2 gene. *Diabetologia* 58, 2288–2297. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3697-2>
- Cao J, Zhao C, Gong L, et al., 2022. MiR-181 Enhances Proliferative and Migratory Potentials of Retinal Endothelial Cells in Diabetic Retinopathy by Targeting KLF6. *Curr Eye Res* 47, 882–888. <https://doi.org/10.1080/02713683.2022.2039206>
- Caporali, A., Emanuelli, C., 2011. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 55, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2011.06.006>
- Chang, Y.-C., Chang, E.Y.-C., Chuang, L.-M., 2015. Recent progress in the genetics of diabetic microvascular complications. *World J Diabetes* 6, 715–25. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i5.715>
- Cho, H., Sobrin, L., 2014. Genetics of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep* 14, 515. <https://doi.org/10.1007/s11892-014-0515-z>
- Chuang, J.C., Jones, P.A., 2007. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res* 61, 24–29. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180457684>
- Cole, J.B., Florez, J.C., 2022. Genetics of diabetes and diabetes complications 16, 377–390. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>.Genetics
- Crim, N., Velez-Montoya, R., Morales-Canton, V., 2017. Surgical Versus Medical Treatment for Diabetic Macular Edema: A Review. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* 6, 136–142.
- Dantas da Costa e Silva, M.E., Polina, E.R., Crispim, D., Sbruzzi, R.C., Lavinsky, D., Mallmann, F., Martinelli, N.C., Canani, L.H., dos Santos, K.G., 2019. Plasma levels of miR-29b and miR-200b in type 2 diabetic retinopathy. *J Cell Mol Med* 23, 1280–1287. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14030>
- Ding, Y., Hu, Z., Luan, J., Lv, X., Yuan, D., Xie, P., Yuan, S., Liu, Q., 2017. Protective effect of miR-200b/c by inhibiting vasohibin-2 in human retinal microvascular endothelial cells, *Life Sciences*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.09.001>
- Feng, B., Chakrabarti, S., 2012. miR-320 Regulates Glucose-Induced Gene Expression in Diabetes. *ISRN Endocrinol* 2012, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/549875>

- Fulzele, S., El-Sherbini, A., Ahmad, S., Sangani, R., Matragoon, S., El-Remessy, A., Radhakrishnan, R., Liou, G.I., 2015. MicroRNA-146b-3p regulates retinal inflammation by suppressing adenosine deaminase-2 in diabetes. *Biomed Res Int* 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/846501>
- Gajewska, B., Śliwińska-Mossoń, M., 2022. Association of MMP-2 and MMP-9 Polymorphisms with Diabetes and Pathogenesis of Diabetic Complications. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms231810571>
- Gomaa, A.R., Elsayed, E.T., Moftah, R.F., 2017. MicroRNA-200b Expression in the Vitreous Humor of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Ophthalmic Res* 58, 168–175. <https://doi.org/10.1159/000475671>
- Gong, Q., Xie, J., Li, Y., Liu, Y., Su, G., 2019. Enhanced ROBO4 is mediated by up-regulation of HIF-1 α /SP1 or reduction in miR-125b-5p/miR-146a-5p in diabetic retinopathy. *J Cell Mol Med* 23, 4723–4737. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14369>
- Greco, M., Chiefari, E., Accattato, F., Corigliano, D.M., Arcidiacono, B., Mirabelli, M., Liguori, R., Brunetti, F.S., Pullano, S.A., Scordia, V., Fiorillo, A.S., Foti, D.P., Brunetti, A., 2020. MicroRNA-1281 as a novel circulating biomarker in patients with diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00528>
- Guo, R., Shen, W., Su, C., Jiang, S., Wang, J., 2017. Relationship between the Pathogenesis of Glaucoma and miRNA. *Ophthalmic Res* 57, 194–199. <https://doi.org/10.1159/000450957>
- Han, H., Chen, N., Huang, X., Liu, B., Tian, J., Lei, H., 2019. Phosphoinositide 3-kinase δ inactivation prevents vitreous-induced activation of AKT/MDM2/p53 and migration of retinal pigment epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 294, 15408–15417. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010130>
- Hirota, K., Keino, H., Inoue, M., Ishida, H., Hirakata, A., 2014. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*.
- Hu, X.Y., Liu, H., Wang, L.N., Ding, Y.Z., Luan, J., 2018. Efficacy and safety of vitrectomy with internal limiting membrane peeling for diabetic macular edema: A meta-analysis. *Int J Ophthalmol* 11, 1848–1855. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.11.18>
- Ismail, A., El-Mahdy, H.A., Eldeib, M.G., Doghish, A.S., 2023. miRNAs as cornerstones in diabetic microvascular complications. *Mol Genet Metab* 138, 106978. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2022.106978>
- Ivastinovic, D., Haas, A., Weger, M., Seidel, G., Mayer-Xanthaki, C., Lindner, E., Guttmann, A., Wedrich, A., 2021. Correction to: Vitrectomy for diabetic macular edema and the relevance of external limiting membrane (BMC Ophthalmology, (2021), 21, 1, (334), 10.1186/s12886-021-02095-y). *BMC Ophthalmol* 21, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12886-021-02118-8>
- Ji, H., Yi, Q., Chen, L., Wong, L., Liu, Y., Xu, G., Zhao, J., Huang, T., Li, B., Yang, Y., Li, W., Han, L., Duan, S., 2020. Circulating miR-3197 and miR-2116-5p as novel biomarkers for diabetic retinopathy. *Clinica Chimica Acta* 501, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.036>
- Ji, Z., Luo, J., Su, T., Chen, C., Su, Y., 2021. Mir-7a targets insulin receptor substrate-2 gene and suppresses viability and invasion of cells in diabetic retinopathy mice via PI3K-AKT-VEGF pathway. *Diabetes Metab Syndr Obes* 14, 719–728. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S288482>
- Jiang, Q., Zhao, F., Liu, X., Li, R., Liu, J., 2015. Effect of miR-200b on retinal endothelial cell function under high glucose environment. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 10482–10487.
- Joglekar, M. v, Januszewski, A.S., Jenkins, A.J., 2016. Circulating microRNA Biomarkers of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 65, 22–24. <https://doi.org/10.2337/dbi15-0028>
- Ju, X., Yang, X., Yan, T., Chen, H., Song, Z., Zhang, Z., Wu, W., Wang, Y., 2019. EGFR inhibitor, AG1478, inhibits inflammatory infiltration and angiogenesis in mice with diabetic retinopathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 46, 75–85. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13029>

- Kantharidis, P., Wang, B., Carew, R.M., Lan, H.Y., 2011. Diabetes complications: the microRNA perspective. *Diabetes* 60, 1832–7. <https://doi.org/10.2337/db11-0082>
- Klein, R., Knudtson, M.D., Lee, K.E., Gangnon, R., Klein, B.E.K., 2010. NIH Public Access. *Ophthalmology* 116, 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.10.016>.The
- Kriegel, A.J., Baker, M.A., Liu, Y., Liu, P., Cowley, A.W., Liang, M., 2015. Endogenous MicroRNAs in human microvascular endothelial cells regulate mRNAs encoded by hypertension-related genes. *Hypertension* 66, 793–799. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05645>
- Lee, R., Wong, T.Y., Sabanayagam, C., 2015. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye Vis (Lond)* 2, 17. <https://doi.org/10.1186/s40662-015-0026-2>
- Lin, W. jian, Ma, X. fei, Hao, M., Zhou, H. ran, Yu, X. yang, Shao, N., Gao, X. yuan, Kuang, H. yu, 2018. Liraglutide attenuates the migration of retinal pericytes induced by advanced glycation end products. *Peptides (N.Y.)* 105, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.05.003>
- Liu, C.-H., Sun, Y., Li, J., Gong, Y., Tian, K.T., Evans, L.P., Morss, P.C., Fredrick, T.W., Saba, N.J., Chen, J., 2015. Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 12163–12168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508426112>
- Liu, H., Li, X., Wu, N., Tong, M., Chen, S., Zhu, S., Qian, W., Chen, X., 2018. Serum microRNA-221 as a biomarker for diabetic retinopathy in patients associated with type 2 diabetes 11, 1889–1894. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.12.02>
- Lorenc, V.E., Lima e Silva, R., Hackett, S.F., Fortmann, S.D., Liu, Y., Campochiaro, P.A., 2020. Hepatocyte growth factor is upregulated in ischemic retina and contributes to retinal vascular leakage and neovascularization. *FASEB Bioadv* 2, 219–233. <https://doi.org/10.1096/fba.2019-00074>
- Majumder, P., Roy, K., Bagh, S., Mukhopadhyay, D., 2019. Receptor tyrosine kinases (RTKs) consociate in regulatory clusters in Alzheimer’s disease and type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 459, 171–182. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03560-5>
- Mastropasqua, R., Toto, L., Cipollone, F., Santovito, D., Carpineto, P., Mastropasqua, L., 2014. Role of microRNAs in the modulation of diabetic retinopathy, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.07.003>
- Mathew, C., Yunirakasiwi, A., Sanjay, S., 2015. Updates in the management of diabetic macular edema. *J Diabetes Res*.
- McArthur, K., Feng, B., Wu, Y., Chen, S., Chakrabarti, S., 2011. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. *Diabetes* 60, 1314–1323. <https://doi.org/10.2337/db10-1557>
- Meng, W., Shah, K.P., Pollack, S., Toppila, I., Hebert, H.L., McCarthy, M.I., Groop, L., Ahlqvist, E., Lyssenko, V., Agardh, E., Daniell, M., Kaidonis, G., Craig, J.E., Mitchell, P., Liew, G., Kifley, A., Wang, J.J., Christiansen, M.W., Jensen, R.A., Penman, A., Hancock, H.A., Chen, C.J., Correa, A., Kuo, J.Z., Li, X., Chen, Y. der I., Rotter, J.I., Klein, R., Klein, B., Wong, T.Y., Morris, A.D., Doney, A.S.F., Colhoun, H.M., Price, A.L., Burdon, K.P., Groop, P.H., Sandholm, N., Grassi, M.A., Sobrin, L., Palmer, C.N.A., 2018. A genome-wide association study suggests new evidence for an association of the NADPH Oxidase 4 (NOX4) gene with severe diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Acta Ophthalmol* 96, e811–e819. <https://doi.org/10.1111/aos.13769>
- Miloudi, K., Oubaha, M., Ménard, C., Dejda, A., Guber, V., Cagnone, G., 2019. NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814711116>
- Minezaki, T., Usui, Y., Asakage, M., Takanashi, M., Shimizu, H., Nezu, N., Narimatsu, A., Tsubota, K., Umazume, K., Yamakawa, N., Kuroda, M., Goto, H., 2020. High-Throughput MicroRNA Profiling of Vitreoretinal Lymphoma: Vitreous and Serum MicroRNA Profiles Distinct from Uveitis. *J Clin Med* 9, 1844. <https://doi.org/10.3390/jcm9061844>
- Nunes, D.N., Dias-Neto, E., Cardo-Vila, M., Edwards, J.K., Dobroff, A.S., Giordano, R.J., Mandelin, J., Brentani, H.P., Hasselgren, C., Yao, V.J., Marchio, S., Pereira, C.A., Passetti, F., Calin, G.A.,

- Sidman, R.L., Arap, W., Pasqualini, R., 2015. Synchronous down-modulation of miR-17 family members is an early causative event in the retinal angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 3770–3775. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500008112>
- Ojeda, J., Villa, T., Murguía, P., Revuelta, M., López, M., Kuri, P., González, F., 2012. Boletín epidemiológico diabetes mellitus tipo 2 primer trimestre-2013. *Secretaria de Salud* 2–7.
- Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., MacDonald, P.E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., Stoffel, M., 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature03076>
- Pramanik, S., Saha, C., Chowdhury, S., Bose, C., Bhattacharyya, N.P., Mondal, L.K., 2022. Decreased Levels of miR-126 and miR-132 in Plasma and Vitreous Humor of Non-Proliferative Diabetic Retinopathy Among Subjects with Type-2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 15, 345–358. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S346097>
- Ragusa, M., Caltabiano, R., Russo, A., Puzzo, L., Avitabile, T., Longo, A., Toro, M.D., di Pietro, C., Purrello, M., Reibaldi, M., 2013. MicroRNAs in vitreous humor from patients with ocular diseases. *Mol Vis* 19, 430–40.
- Ruiz, M.A., Chakrabarti, S., 2013. MicroRNAs: The Underlying Mediators of Pathogenetic Processes in Vascular Complications of Diabetes. *Can J Diabetes*.
- Ruiz MA, Feng B, C.S., 2015. Polycomb Repressive Complex 2 Regulates MiR- 200b in Retinal Endothelial Cells: Potential Relevance in Diabetic Retinopathy. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123987e>
- Russo, A., Ragusa, M., Barbagallo, C., Longo, A., Avitabile, T., Uva, M.G., Bonfiglio, V., Toro, M.D., Caltabiano, R., Mariotti, C., Boscia, F., Romano, M., di Pietro, C., Barbagallo, D., Purrello, M., Reibaldi, M., 2017. MiRNAs in the vitreous humor of patients affected by idiopathic epiretinal membrane and macular hole. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174297>
- Sabbah, N.A., Saad, M.S.S., 2016. Role of MicroRNA 126 in Screening , Diagnosis , and Prognosis of Diabetic Patients in Egypt. *IUBMB Life* 452–458. <https://doi.org/10.1002/iub.1502>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H.R., Soleymani Fard, S., Ghaffari, S.H., 2019. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* 234, 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Sarai, K., Shikata, K., Shikata, Y., Omori, K., Watanabe, N., Sasaki, M., Nishishita, S., Wada, J., Goda, N., Kataoka, N., Makino, H., 2009. Endothelial barrier protection by FTY720 under hyperglycemic condition: Involvement of focal adhesion kinase, small GTPases, and adherens junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, 945–955. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00606.2008>
- Saravani, S., Yari, D., Saravani, R., Ahmadabadi, C.A., 2017. Association of COL4A3 (rs55703767), MMP-9 (rs17576) and TIMP-1 (rs6609533) gene polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes. *Biomed Rep* 6, 329–334. <https://doi.org/10.3892/br.2017.856>
- Sarray, S., Dallel, M., Lamine, L. Ben, Jairajpuri, D., Sellami, N., Turki, A., Malalla, Z., Brock, R., Ghorbel, M., Mahjoub, T., 2021. Association of matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes: A case control study. *J Diabetes Complications* 35, 107908. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.107908>
- Shraim, B.A., Moursi, M.O., Benter, I.F., Habib, A.M., Akhtar, S., 2021. The Role of Epidermal Growth Factor Receptor Family of Receptor Tyrosine Kinases in Mediating Diabetes-Induced Cardiovascular Complications. *Front Pharmacol* 12, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.701390>
- Silambarasan, M., Tan, J.R., Karolina, D.S., Armugam, A., Kaur, C., Jeyaseelan, K., 2016. MicroRNAs in Hyperglycemia Induced Endothelial Cell Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 17, 518. <https://doi.org/10.3390/ijms17040518>
- Singh, Kanhaiya, Agrawal, N.K., Gupta, S.K., Singh, Kiran, 2013. A functional single nucleotide polymorphism -1562c>t in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers. *International Journal of Lower Extremity Wounds* 12, 199–204. <https://doi.org/10.1177/1534734613493289>

- Sun, L.L., Li, W.D., Lei, F.R., Li, X.Q., 2018. The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases. *J Cell Mol Med* 22, 4568–4587. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13700>
- Tayyari, F., Khuu, L.A., Sivak, J.M., Flanagan, J.G., Singer, S., Brent, M.H., Hudson, C., 2019. Retinal blood oxygen saturation and aqueous humour biomarkers in early diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 97, e673–e679. <https://doi.org/10.1111/aos.14016>
- Thallas-Bonke, V., Jha, J.C., Gray, S.P., Barit, D., Haller, H., Schmidt, H.H.H.W., Coughlan, M.T., Cooper, M.E., Forbes, J.M., Jandeleit-Dahm, K.A.M., 2014. Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- α -associated mechanisms in diabetic nephropathy. *Physiol Rep* 2, 1–13. <https://doi.org/10.14814/phy2.12192>
- Villegas-Ruiz, V., Hendlmeier, F., Buentello-Volante, B., Rodríguez-Loaiza, J.L., Miranda-Duarte, A., Zenteno, J.C., 2017. Genome-wide mRNA analysis reveals a TUBD1 isoform profile as a potential biomarker for diabetic retinopathy development. *Exp Eye Res* 155, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.01.004>
- Wang JH, Chuang YF, Chen J, et al., 2022. Integrative Multi-Omics Analysis Reveals MicroRNA-143 as a Potential Therapeutic to Attenuate Retinal Angiogenesis. *Nucleic Acid Ther.* 32, 251–266. <https://doi.org/doi:10.1089/nat.2021.0111>
- Wang, W., Li, Z., Zheng, Y., Yan, M., Cui, Y., Jiang, J., 2019. Circulating microRNA-92a level predicts acute coronary syndrome in diabetic patients with coronary heart disease 0, 1–8.
- Wang, Y., Lin, W., Ju, J., 2020. MicroRNA-409-5p promotes retinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Cell Cycle* 19, 1314–1325. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1749484>
- Wu, J.H., Gao, Y., Ren, A.J., Zhao, S.H., Zhong, M., Peng, Y.J., Shen, W., Jing, M., Liu, L., 2012. Altered microRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res* 47, 195–201.
- Xiong, F., Dy, X., Hu, J., Li, T., Du, S., Wu, Q., 2014. Altered Retinal MicroRNA Expression Profiles in Early Diabetic Retinopathy: An In Silico Analysis. *Curr Eye Res* 39, 720–9. <https://doi.org/10.3109/02713683.2013.872280>
- Yang, Y., Liu, Y., Li, Y., Chen, Z., Xiong, Y., Zhou, T., Tao, W., Xu, F., Yang, H., Ylä-herttuala, S., Chaurasia, S.S., Adam, W., Yang, K., 2020. MicroRNA-15b Targets VEGF and Inhibits Angiogenesis in Proliferative Diabetic Retinopathy 105, 3404–3415. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa538>
- Yau, J.W.Y., Rogers, S.L., Kawasaki, R., Lamoureux, E.L., Kowalski, J.W., Bek, T., Chen, S.-J., Dekker, J.M., Fletcher, A., Grauslund, J., Haffner, S., Hamman, R.F., Ikram, M.K., Kayama, T., Klein, B.E.K., Klein, R., Krishnaiah, S., Mayurasakorn, K., O’Hare, J.P., Orchard, T.J., Porta, M., Rema, M., Roy, M.S., Sharma, T., Shaw, J., Taylor, H., Tielsch, J.M., Varma, R., Wang, J.J., Wang, N., West, S., Xu, L., Yasuda, M., Zhang, X., Mitchell, P., Wong, T.Y., 2012. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 35, 556–64. <https://doi.org/10.2337/dc11-1909>
- Ye, P., Liu, J., He, F., Xu, W., Yao, K., 2013. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *Int J Med Sci* 11, 17–23. <https://doi.org/10.7150/ijms.7329>
- You, M., Xia, X., Li, H., Wu, J., Rong, R., Zeng, Z., Xiong, K., Huang, J., Tang, L., Lei, H., Wu, W., Ji, D., 2020. Normal vitreous promotes angiogenesis via the epidermal growth factor receptor. *FASEB Journal* 34, 14799–14809. <https://doi.org/10.1096/fj.201902862RRR>
- Yun, J.H., 2021. Hepatocyte growth factor prevents pericyte loss in diabetic retinopathy. *Microvasc Res* 133, 104103. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104103>
- Zampetaki, A., Willeit, P., Burr, S., Yin, X., Langley, S.R., Kiechl, S., Klein, R., Rossing, P., Chaturvedi, N., Mayr, M., 2016a. Angiogenic microRNAs linked to incidence and progression of diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 65, 216–227. <https://doi.org/10.2337/db15-0389>
- Zampetaki, A., Willeit, P., Burr, S., Yin, X., Langley, S.R., Kiechl, S., Klein, R., Rossing, P., Chaturvedi, N., Mayr, M., 2016b. Angiogenic microRNAs linked to incidence and progression of diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db15-0389>

- Zhang, J., Cui, C., Xu, H., 2019. Downregulation of miR-145-5p elevates retinal ganglion cell survival to delay diabetic retinopathy progress by targeting FGF5. *Biosci Biotechnol Biochem* 83, 1655–1662. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1630251>
- Zhang, J., Wu, L., Chen, J., Lin, S., Cai, D., Chen, C., Chen, Z., 2018. Downregulation of MicroRNA 29a/b exacerbated diabetic retinopathy by impairing the function of Müller cells via Forkhead box protein O4. *Diab Vasc Dis Res* 15, 214–222. <https://doi.org/10.1177/1479164118756239>
- Zhang, Y., Sun, X., Icli, B., Feinberg, M.W., 2018. Emerging Roles for MicroRNAs in Diabetic Microvascular Disease: Novel Targets for Therapy 38, 145–168. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1122>
- Zhang, Z., Song, C., Wang, T., Sun, L., Qin, L., Ju, J., 2021. miR-139-5p promotes neovascularization in diabetic retinopathy by regulating the phosphatase and tensin homolog. *Arch Pharm Res* 44, 205–218. <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01308-8>

ANEXO 1.

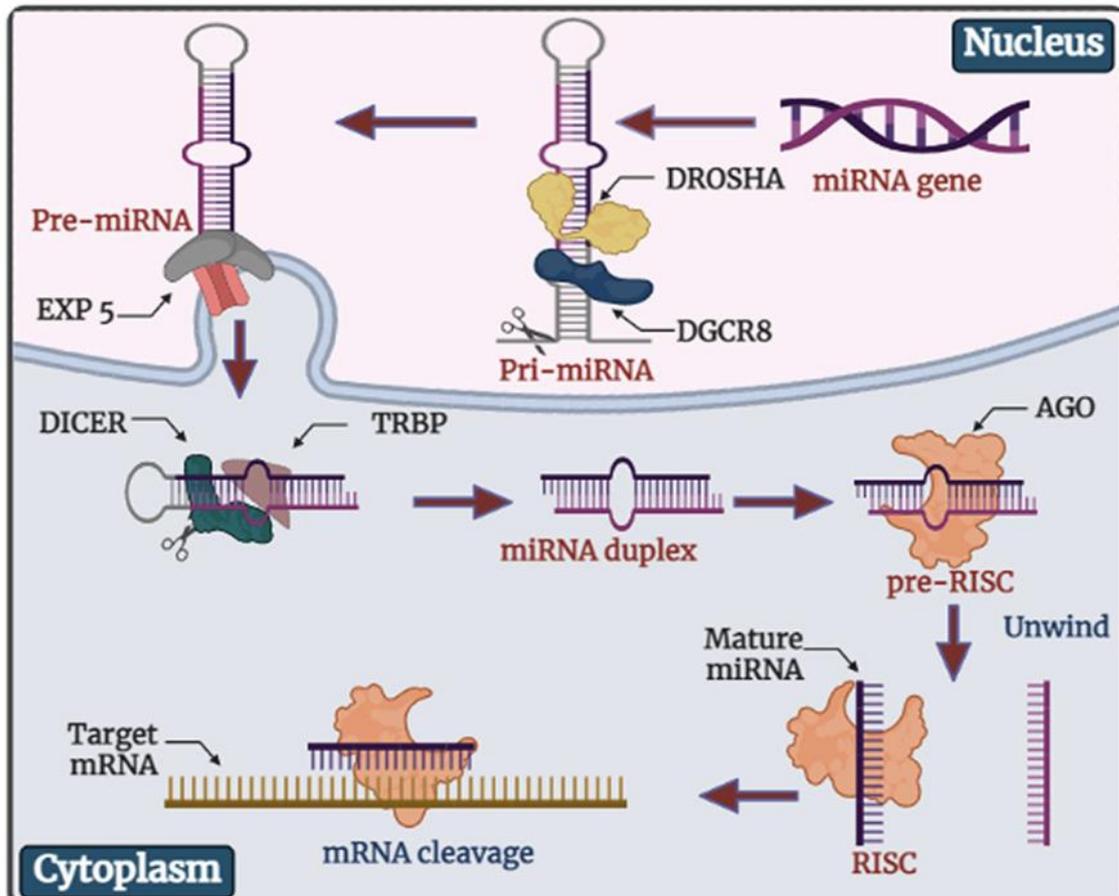


Figura tomada de (Ismail et al., 2023)

Biogénesis de los miRNAs.

Los miRNAs son inicialmente transcritos por la RNA polimerasa II en el núcleo a una forma larga denominada miRNA primario, con una estructura de tallo y asa, en la cual se encuentran las secuencias del futuro miRNA maduro. La enzima ribonucleasa III Drosha, escinde a pri-miRNA a una forma más corta de aprox 70 pares de bases para formar el precursor-miRNA (pre-miRNA). Drosha es una RNAasa no específica. Para mediar la génesis de los miRNAs desde el pre-miRNA, ésta forma un complejo proteico de aproximadamente 600 kDa, denominado microprocesador, con el cofactor esencial DGCR8, también conocido como Pasha. La escisión específica en la estructura de tallo-asa es dirigida por Pasha. Seguido a la escisión por Drosha, los pre-miRNAs son exportados por exportina 5 del núcleo al citoplasma, donde ocurre la maduración de los miRNAs. Una vez en el citoplasma, el pre-miRNAs son cortados por otra RNAasa III llamada Dicer, en un duplex pequeño, imperfecto, que contiene ambos, la cadena Madura y su complementaria. Después de la ruptura por Dicer, el resultado es una cadena duplex de 21 a 24 nucleótidos. Una de las cadenas (pasajera) se suelta y desaparece o degrada. La otra (guía) se convierte en el miRNA maduro. Estudios recientes demuestran que hay una región semilla en el miRNA, del nucleótido 2 al 8 que sirve de reconocimiento y acoplamiento con su RNAm.

ANEXO 2.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:

“Análisis de expresión diferencial de miRNAs en vítreo y suero de pacientes con Agujero Macular Idiopático en comparación con pacientes con Retinopatía Diabética Proliferativa y Edema Macular Diabético”

Investigador principal: Dra. Adriana Solís Vivanco.

Dirección del investigador: Av. México – Xochimilco 289. Col. Arenal de Guadalupe, delegación Tlalpan. C.P. 14389. INR. Servicio de Oftalmología.

Teléfono de contacto del investigador: 59 99 10 00 ext. 18175

Investigadores participantes: Dr. Alberto Hidalgo Bravo, Dra. Dalila Rodríguez Juárez , Dra. Margarita Valdés Flores, Dra. Ana Cristina García Ulloa.

Versión del consentimiento informado y fecha de su preparación: Versión 2. Fecha de preparación: 24 de mayo del 2018

INTRODUCCIÓN:

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios que esto implica, con el fin de tomar una decisión informada. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación, la cual podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al terminar de leer este documento se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

INVITACION A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado

Sr.(a) _____

El Servicio de Retina del Instituto Nacional de Rehabilitación le invita a participar en este estudio que tiene como objetivo el análisis de algunas características moleculares de su sangre y vítreo (ojo) para contribuir en el conocimiento de las características genéticas de los pacientes diabéticos mexicanos. Esto tiene como objetivo el futuro desarrollo de medicamentos que puedan prevenir la evolución del padecimiento a estadios graves de las complicaciones de la Diabetes a nivel oftalmológico, lo cual resulta en la discapacidad visual por Diabetes Mellitus (primera causa de ceguera en nuestro país).

Antes que nada debe saber que durante el presente estudio, NO SE LE REALIZARÁN MANIOBRAS, CIRUGÍAS, PROCEDIMIENTOS O NINGÚN TIPO DE MANIPULACIÓN EXTRA A LO QUE SU PADECIMIENTO REQUIERE. Es decir, si en este momento se le está invitando a participar en el estudio, es porque hemos detectado que usted es candidato a cirugía de retina (Vitrectomía) como parte del tratamiento que requiere para resolver o frenar el problema de sus ojos y por tanto, le estamos solicitando su consentimiento para analizar dos muestras suyas:

1.-Cinco mililitros de sangre que son tomadas en el momento de la canalización de su vena, antes de la cirugía. Cabe resaltar que la canalización venosa es un procedimiento que se le realiza a todos los pacientes que se someten a una cirugía oftalmológica, sea cual sea, con la finalidad de tener una vía de administración de medicamentos que pueda requerir durante su procedimiento. La toma de muestra de sangre **NO IMPLICA PARA USTED UNA MOLESTIA EXTRA NI UNA PUNCIÓN ADEMÁS DE LA QUE SE LE VA A REALIZAR COMO PARTE DEL PROTOCOLO ANTES DE SU CIRUGÍA**. Es decir, la solicitud que le hacemos es la de poder extraer una muestra de su sangre en dicho momento para poder ser analizada en el Laboratorio de Genética de esta Institución.

2.-0.3 mililitros del vítreo que vamos a retirar de su ojo (Vitreotomía). Dicho de otra forma, el líquido que le es retirado de su ojo durante la cirugía y el cual normalmente se deshecha. Esta muestra es tomada directamente de las mangueras del equipo con el que lo operamos y **TAMPOCO IMPLICA UNA MANIOBRA EXTRA** para su ojo. De igual forma que la muestra de su sangre, esta pequeña muestra se conserva en un recipiente especial muy pequeño y se llevará al Servicio de Genética para ser analizada.

Si usted es candidato a participar en el presente estudio, es porque cumple los siguientes requisitos dependiendo si es o no diabético:

Pacientes Diabéticos:

- Cualquier género, mayor a 18 años y con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2.
- Haber tenido padres, abuelos y bisabuelos nacidos en México.
- Contar en este momento con uno de los siguientes diagnósticos:

1.-Retinopatía Diabética Proliferativa con Características de Alto Riesgo sin Edema Macular Diabético .

Las características de alto riesgo (CAR) se refieren a la presencia de sangre en el interior de su ojo y/o de vasos sanguíneos nuevos (neovasos) propensos a sangrar.

2.-Edema Macular Diabético Difuso Severo con Retinopatía Diabética no Proliferativa .

El Edema Macular Diabético se refiere a la presencia de líquido entre las células que conforman el centro de su retina (mácula) y que conlleva una pérdida de su visión central.

La Retinopatía Diabética no Proliferativa se refiere a que en su retina aún no se desarrollan vasos sanguíneos nuevos propensos a sangrar en el interior de su ojo.

Otras características:

- Que no haya sido tratado con inyecciones intraoculares en los últimos seis meses.
- Que no haya sido operado previamente de la retina del ojo que vamos a operar.

Pacientes No Diabéticos:

Cualquier género, mayor a 18 años y dispuesto a descartar con estudios de laboratorio (Glucosa en ayuno y Hemoglobina glicosilada) el diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2.

Con uno de los siguientes diagnósticos:

1.-Membrana Epi-retiniana Idiopática.

Se refiere a la presencia de un tejido pegado al centro de retina (mácula) que genera pliegues en ella y por ende distorsiona la imagen que usted percibe.

2.-Agujero Macular Idiopático.

Se refiere a la presencia de una pérdida de continuidad (agujero) en el tejido central de la mácula, es decir, un agujero al centro de su visión que le genera un escotoma o área de NO visión al centro de la imagen.

Otras características:

- Que no haya sido tratado con inyecciones intraoculares en los últimos seis meses.
- Que no haya sido operado previamente de la retina del ojo que vamos a operar.

Cualquiera que sea su caso, el médico tratante del Servicio de Retina del INR le dará una explicación amplia de su padecimiento y del por qué es candidato a cirugía.

Cualquiera de los cuatro diagnósticos mencionados requieren Vitrectomía vía pars plana para el abordaje quirúrgico resolutivo de su padecimiento.

Cada uno de los diagnósticos mencionados tiene diferente pronóstico para la visión así como cada paciente en particular. Usted debe hacer todas las preguntas sobre esto a su médico, de tal forma que le quede muy claro lo que puede esperar como resultado visual después de su cirugía y el hecho de participar o no participar en el estudio, de ningún modo modifica su pronóstico de visión, ni a favor ni en contra. El pronóstico o esperanza de mejorar la visión después de su cirugía depende de muchos factores que en cada paciente son muy particulares como tiempo de evolución del padecimiento, estado de salud en general, apego a indicaciones postquirúrgicas, etc... por ello es muy importante que platique con su médico sobre sus expectativas y su caso en particular.

Su participación es **VOLUNTARIA**. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con el Instituto Nacional de Rehabilitación o su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho. Si usted decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención médica. Cabe señalar que en el presente estudio NO se le va a solicitar ningún tipo de participación después de su cirugía. El estudio consiste en analizar en UNA SOLA OCASIÓN las muestras que obtengamos de usted, en caso de aceptar.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

La toma de muestras se realizará el día de su cirugía.

La muestra de sangre se tomará al momento de la canalización venosa la cual forma parte de su preparación de ingreso a quirófano.

Usted notará que recolectamos aproximadamente cinco mililitros de sangre en un tubo de laboratorio y esto no implicará otra punción en su brazo.

La muestra de vítreo se tomará del equipo de cirugía. Durante su cirugía, de manera normal, unas mangueritas estériles se van quedando con el líquido que sale de su ojo, el cual nunca pierde su forma gracias a la entrada de otro líquido que mantiene la presión necesaria para que así sea. La toma de la muestra de vítreo consiste simplemente en recolectar el primer medio mililitro que sale del ojo, a través de la aspiración directa a las mangueras del aparato vitrector. Esto no pone en riesgo a su ojo de ninguna manera ni implica una intervención no prevista, es decir, usted no notará ni sentirá nada al momento de la toma de esta muestra.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

El costo de la cirugía y los exámenes de laboratorio prequirúrgicos se ajustarán a las mismas tarifas establecidas por el instituto para la atención del paciente en general. Participar del estudio no le generará ningún gasto extra así como no le ahorrará nada del costo normal de su cirugía de acuerdo al nivel socioeconómico que Trabajo Social le asigne. **El único beneficio que podemos asegurarle al participar de este estudio es estar contribuyendo al conocimiento de las bases genéticas de los pacientes mexicanos diabéticos para el futuro desarrollo de medicamentos preventivos de la ceguera.**

RIESGOS E INCONVENIENTES

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación.

Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos de complicaciones.

Los riesgos de la toma de muestra de vítreo son: Ninguno. Es decir, la toma de muestra de vítreo no añade ningún riesgo al evento quirúrgico.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de sus muestras y de su información.

BENEFICIOS POTENCIALES

En caso de no conocerse diabético, el beneficio potencial que obtendrá es corroborar su situación de NO diabético o, en caso de que así lo determinen sus laboratorios previos a la cirugía, contar con un diagnóstico temprano de Diabetes, lo cual promueve el tratamiento temprano y la prevención de complicaciones.

En caso de conocerse diabético, el beneficio potencial que obtendrá es su contribución al estudio genético de pacientes mexicanos que como usted, se encuentran en la esperanza de contar con terapias preventivas que impidan el desarrollo de la ceguera como complicación de su Diabetes Mellitus.

COMPENSACIÓN

No contamos con presupuesto para financiar compensaciones por lesiones, pero por el tipo de maniobra que el presente estudio implica, NO es factible provocar en usted un tipo de lesión discapacitante ni mucho menos. El Instituto Nacional de Rehabilitación no brinda ningún tipo adicional de compensación para cubrir daños.

POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO

A pesar de ser una investigación cuya finalidad es detectar nuevos blancos terapéuticos para las microangiopatías diabéticas de la retina, por el momento no se prevee que esta investigación pueda generar de manera directa un producto que pueda comercializarse; por lo que de ningún modo se espera que los pacientes y/o los investigadores gocen de algún beneficio económico producto de la investigación a nivel farmacéutico comercial.

ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos en cualquier momento. En caso de resultar diabético sin conocerse antes como tal, se le informará debidamente, se le proporcionará la atención a su padecimiento oftalmológico pero deja de ser candidato a participar en el estudio. A cerca de las conclusiones del estudio, puede preguntarlas a la Dra. Adriana Solís Vivanco en el Servicio de Retina con Tel. 59991000 y ext 18175. La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios años.

CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN:

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar

cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas así como su información médica y/o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto. Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 5 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave y solo tendrán acceso los investigadores. Existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio. Su confidencialidad será protegida como lo marca la ley. Será mantenida asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o

- Es solicitado por la ley.

Monitores o auditores del estudio podrán tener acceso a la información de los participantes.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

La Comisión de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación aprobó la realización de este estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con dicha Comisión de Ética que supervisa el estudio para decidir la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice re-contactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Para estudios genéticos:

Por su participación, el investigador puede solicitarle información médica de los miembros de su familia.

Su material genético no será usado con fines distintos a los mencionados en este documento. Si el investigador desea usarlo con fines distintos deberá notificárselo, solicitar su autorización y solicitarle su firma en un documento similar a éste.

Los resultados de los estudios genéticos no serán incluidos en su expediente, a menos que tengan implicaciones para su tratamiento.

Los resultados de estudios genéticos podría ser causa de discriminación para las personas que tengan alguna anomalía que los predisponga para sufrir una enfermedad. Tomaremos las acciones necesarias para evitar que su información sea conocida por terceros que pudieran tomar acciones discriminatorias contra usted.

IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:

En caso de que usted tenga preguntas sobre el estudio, por favor póngase en contacto con la Dra. Adriana Solís Vivanco del Servicio de Retina del INR.

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas me han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales,

particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas (sangre y orina) para ser utilizadas en éste estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas:

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. Si aplica :¿Autoriza se dé acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios a_____, sus representantes, los auditores, oficinas regulatorias del estudio, otras agencias gubernamentales de la salud en México y posiblemente otras agencias gubernamentales de la salud en otros países en donde se pueda considerar al fármaco en estudio para la aprobación de su comercialización?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo al participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
k. ¿Comprende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no cumplió con los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
l. Si aplica ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Declaración del paciente:

Yo, _____ declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si los solicito. Si yo tengo preguntas sobre el estudio o sobre mis derechos como participante, puedo ponerme en contacto con la Dra. Adriana Solís Vivanco. Estoy de acuerdo en informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud (por ejemplo, uso de nuevos medicamentos, cambios en el consumo de tabaco o en la ciudad donde resido, etc) tan pronto como sea posible. He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Nombre y Firma del Participante

Fecha

Coloque su huella digital si no sabe escribir

Nombre y Firma del Investigador

Fecha en que explicó el documento

Nombre del Testigo 1

Firma del Testigo 1

Fecha

Relación con el participante: _____

El presente documento es original y consta de 10 páginas

ANEXO 3.

Hoja de recolección de datos clínicos

Ficha de identificación		
Nombre:	Apellidos:	Fecha de Nacimiento:
Edad:	Género:	Registro:
	M	F
Lugar de nacimiento:	Teléfono casa:	Teléfono celular:

Historia clínica.

Padecimiento de Base		SI	N O
Retinopatía Diabética Proliferativa	Presencia de restos de sangre en vítreo		
Edema Macular Diabético	Tiempo de último tratamiento		
Agujero Macular	Se descarta Diabetes Mellitus		
Membrana Epi-retiniana	Se descarta Diabetes Mellitus		

Antecedentes Personales Patológicos	
Padecimiento	Medicamentos Relacionados
Diabetes Mellitus	
Hipertensión Arterial Sistémica	
Insuficiencia Renal Crónica	
Hipercolesterolemia/trigliceridemia	
Cardiopatía	
Lupus	
Artritis Reumatoide	
Púrpura	
Parkinson	
Alzheimer	
Esclerosis Múltiple	
Cáncer de _____	
Quimioterapia previa o actual	
Otros padecimientos	

Se toma muestra :	Etiquetado correcto	Hora de toma	Hora de traslado	Estabilidad de la muestra	Cadena fría	Centrifugación	Almacenaje - 70 grados
Suero							
Vítreo							

ANEXO 4.

Comité de Ética e Investigación Instituto Nacional de Rehabilitación.

		 <p>Instituto Nacional de Rehabilitación Comité de Investigación "2016. Año del Nuevo Sistema de Justicia Penal"</p>				
INR/CI/104/16						
Ciudad de México a 26 de Mayo 2016.						
<p>Dra. Adriana Solís Vivanco Investigador responsable. Presente.</p>						
<p>En respuesta a la solicitud que usted amablemente envió a este comité para la revisión del proyecto de investigación titulado "Análisis de expresión diferencial de miRNAs en vitreo de pacientes con agujero macular idiopático en comparación con vitreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa y edema macular diabético."</p>						
<p>Le informo que el Comité de Investigación decidió aprobarlo otorgándole registro definitivo 19 /16</p>						
<p>Estatus del proyecto: APROBADO</p>						
<p>Investigador Responsable: Adriana Solís Vivanco</p>						
<p>Participantes:</p> <table border="0" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 50%;">Alberto Hidalgo Bravo</td><td style="width: 50%;">Margarita Valdés Flores</td></tr><tr><td>Ana Cristina Ulloa</td><td>Francisca Domínguez Dueñas</td></tr></table>			Alberto Hidalgo Bravo	Margarita Valdés Flores	Ana Cristina Ulloa	Francisca Domínguez Dueñas
Alberto Hidalgo Bravo	Margarita Valdés Flores					
Ana Cristina Ulloa	Francisca Domínguez Dueñas					
<p>Cabe señalar, que de acuerdo con los datos declarados en el cronograma de actividades del proyecto de investigación, éste tiene una vigencia de 24 meses; siendo la fecha de termino 31 de Mayo de 2018, es requisito informar los avances del mismo cada 6 meses, en el formato F01-PR-DI-04 Seguimiento de Protocolos, el cual se encuentra disponible en la página electrónica del INR, así como cualquier otro asunto relacionado con el mismo.</p>						
<p>No omito comentar que en el caso de los protocolos que incluyan pacientes, un requisito adicional de la Dirección de Investigación es dar cumplimiento a la Encuesta de Satisfacción de Pacientes en protocolo F01-PR-DI-08 que se encuentra disponible en la página del INR en la Sección de Documentos ISO en el apartado de Investigación. http://isc9001.inr.gob.mx/Descargas/iso/Formatos/F01-PR-DI-08.doc.</p>						
<p>En caso de ser un protocolo con financiamiento de la industria éste deberá contar con convenio administrativo el cual debe ser sancionado por el área jurídica de este Instituto.</p>						
1/2						
 <p>Hospital Certificate Consejo de Salud Pública 2012-2015</p>	 <p>División de Rehabilitación Ortopédica Centro Colaborador de la OMS/OPS para la Investigación y Rehabilitación Médica 2011-2015</p>	 <p>Certificado EUBEN 0540133 ISO 9001:2008 2012-2015</p>				
<p>Calle México No. 289, Col. Arzobispo, C.P. 14309, Delegación Tlalpa, México, D.F. Tel.: (55) 5099 1000 www.inr.gob.mx</p>						

Estatus : APROBADO

Registro definitivo: 19/16

ANEXO 5.

Apoyos financieros y optimización de recursos

CONVENIO DE ASIGNACIÓN DE RECURSOS

I000/654/2016 ACTUALIZACIÓN MOD.ORD./23/2016 FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL CAR GENERAL 00000000273192

CONVENIO DE ASIGNACIÓN DE RECURSOS QUE CELEBRAN POR UNA PARTE, NACIONAL FINANCIERA, S.N.C., I.B.D., FIDUCIARIA DEL FIDEICOMISO PÚBLICO DE ADMINISTRACIÓN E INVERSIÓN DENOMINADO “FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL”, EN LO SUCESIVO EL “FONDO”, REPRESENTADO EN ESTE ACTO POR EL DR. RODOLFO CANO JIMÉNEZ, EN SU CARÁCTER DE SECRETARIO ADMINISTRATIVO, ASISTIDO POR LA M. EN C. MARGARITA IRENE CALLEJA Y QUEVEDO, EN SU CARÁCTER DE SECRETARIO TÉCNICO; Y POR LA OTRA, EL/LA SECRETARIA DE SALUD / INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION, EN LO SUCESIVO EL “SUJETO DE APOYO”, REPRESENTADO POR EL/LA DR. JOSE CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEON, EN SU CALIDAD DE REPRESENTANTE LEGAL, INSTRUMENTO QUE SUJETAN AL TENOR DE LOS ANTECEDENTES, DECLARACIONES Y CLÁUSULAS SIGUIENTES:

ANTECEDENTES

1. El artículo 1, fracciones I y II de la Ley de Ciencia y Tecnología (LCyT), regula los apoyos que el Gobierno Federal se encuentra obligado a otorgar para impulsar, fortalecer, desarrollar y consolidar la investigación científica, el desarrollo tecnológico y la innovación general en el país, así como determinar los instrumentos, mediante los cuales éste cumplirá con dicha obligación.
2. La Ley Orgánica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología dispone, en su artículo 13, que la canalización de recursos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, en lo sucesivo el “**CONACYT**”, a programas, proyectos, estudios, investigaciones específicas, otorgamiento de becas en sus diferentes modalidades y cualquier otro apoyo o ayuda de carácter económico que convenga o proporcione, estará siempre sujeta a la celebración de un Contrato o Convenio, según sea el caso.
3. El Plan Nacional de Desarrollo (PND) 2013-2018, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 20 de mayo de 2013, establece en su Objetivo 3.5 Hacer del desarrollo científico, tecnológico y la innovación pilares para el progreso económico y social sostenible.
4. El Programa Especial de Ciencia, Tecnología e Innovación (**PECITI**), publicado en el Diario Oficial de la Federación el 30 de julio de 2014, cuyos objetivos, estrategias y líneas de acción deberán alinearse con la Meta III y el Objetivo 3.5 del PND, establecen la obligación de contribuir a que la inversión nacional en investigación
5. Con fecha 20 de septiembre de 2002, la Secretaría de Salud (“**SECRETARÍA**”), el Instituto Mexicano del Seguro Social (“**IMSS**”) y el “**CONACYT**” con fundamento en los artículos 23, fracción II, 25 y 26 de la LCyT, celebraron un Convenio para establecer el “**FONDO**”.
6. Con fecha 3 de septiembre de 2003, se suscribió un Convenio Modificatorio al “**CONTRATO**” con objeto de formalizar la incorporación del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (“**ISSSTE**”), al Convenio celebrado por la “**SECRETARÍA**”, el “**IMSS**” y el “**CONACYT**”, con fecha 20 de septiembre de 2002.
7. El “**FONDO**”, en términos del artículo 25, fracción II de la LCyT, considera como sujetos de apoyo a las Universidades e Instituciones de Educación Superior, públicas y particulares, centros, laboratorios, empresas públicas y privadas y demás personas que se inscriban en el **Registro Nacional de Instituciones y Empresas Científicas y Tecnológicas (RENIECYT)**, los cuales son elegidos mediante concurso y bajo las

modalidades que expresamente determine el Comité Técnico y de Administración, con apego a las Reglas de Operación del Fideicomiso y según la Convocatoria correspondiente.

8. En fecha 22 de febrero de 2016, se publicó la Convocatoria denominada: **“Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT, Convocatoria 2016”**, en lo sucesivo la **“CONVOCATORIA”**, con las categorías FOSISS 2016-1 (Convocatoria de problemas específicos del sector salud) y FOSISS 2016-2 (Investigadores jóvenes).
9. El Comité Técnico y de Administración, en su Trigésima Sesión Ordinaria, de fecha 02 de agosto de 2016, autorizó la canalización de recursos a favor del **“SUJETO DE APOYO”** por un monto de **\$700,000.00 (SETECIENTOS MIL PESOS 00/100 MN)**, para el desarrollo de la propuesta denominada **“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIRNAS EN VÍTREO DE PACIENTES CON AGUJERO MACULAR IDIOPÁTICO EN COMPARACIÓN CON VÍTREO DE PACIENTES CON RETINOPATÍA DIABÉTICA PROLIFERATIVA Y EDEMA MACULAR DIABÉTICO”**, en lo sucesivo el **“PROYECTO”**.

Se concluyó con éxito la ministración de los recursos. Fueron entregados los reportes financieros y técnicos en tiempo y forma.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Dra. Marcela Lizano Soberón

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Irma Isordia Salas

Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Ángel Nava Castañeda

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Dr. Jans Fromow Guerra

Asociación para Evitar la Ceguera en México

Dr. Alberto Hidalgo Bravo

Instituto Nacional de Rehabilitación LGII