



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS -1082, -819 Y -592 DEL GEN DE LA INTERLEUCINA-10 CON RETINOPATÍA DIABÉTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 DEL HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ".

**TÉSIS:
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

DRA. PATRICIA ELVIRA SÁNCHEZ VALENCIA

TUTOR

**Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz
Investigador en Ciencias Médicas "D"
Jefa de Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"**

Ciudad de México, agosto de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



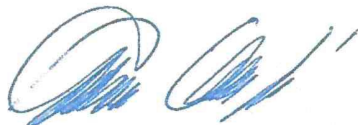
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AUTORIZACIONES

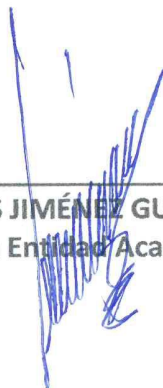


DRA. MARÍA ANGÉLICA ALFONSINA OLIVO DÍAZ
TUTORA

Investigador en Ciencias Médicas "D"
Jefa de Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad

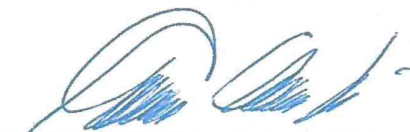
DRA. SARA LUZ MORALES LÁZARO
COMITÉ TUTOR

M. EN C. YOLANDA SALDAÑA ÁLVAREZ
COMITÉ TUTOR



DR. CARLOS JIMÉNEZ GUTIÉRREZ
Responsable de la Entidad Académica HGGEA

Este trabajo de tesis con número de registro: 12-21-2020 presentado por la Dra. Patricia Elvira Sánchez Valencia y se presenta en forma con visto bueno por la tutora y miembro del Comité Tutor de la tesis Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz con fecha mayo de 2023 para su impresión final.

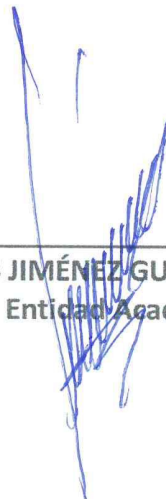


DRA. MARÍA ANGÉLICA ALFONSINA OLIVO DÍAZ

TUTORA

Investigador en Ciencias Médicas "D"

Jefa de Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad



DR. CARLOS JIMÉNEZ GUTIÉRREZ

Responsable de la Entidad Académica HGGEA

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS -1082, -819 Y -592 DEL GEN DE LA INTERLEUCINA-10 CON
RETINOPATÍA DIABÉTICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 DEL HOSPITAL GENERAL "DR.
MANUEL GEA GONZÁLEZ".**

Este estudio fue realizado en el Hospital General "Dr. Manuel Gea González" en el Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad y en la División de Medicina Interna bajo la dirección de la Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz con el apoyo de los adscritos de la División quienes hicieron sugerencias de mejora en el desarrollo y conclusión de este estudio.

COLABORADORES:



Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz
Investigador Principal



Dra. Patricia Elvira Sánchez Valencia
Investigador Asociado Principal

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, agradezco a todos los miembros del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud por su apoyo incondicional en tiempos tan difíciles como la emergencia sanitaria vivida desde el año 2020. Agradezco de forma particular a la Dra. Teresa Imelda Fortoul Van Der Goes por su gran apoyo y comprensión.

En segundo lugar, quisiera agradecer al Comité Tutor que me ha brindado su conocimiento y me ha encaminado de la mejor manera posible (Dra. Sara Luz Morales Lázaro, M. en C. Yolanda Saldaña Álvarez). Agradezco de manera muy especial a la Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz por toda su paciencia y comprensión. A pesar de las dificultades que implicó cursar la maestría en conjunto con la especialidad (y subespecialidad) y el inconveniente sanitario que implicó la pandemia por SARS-CoV2, en ningún momento limitó su apoyo y siempre buscó la manera de impulsar mi desarrollo. Hago especial mención al Dr. Ricardo González Ramírez, quien de igual manera apoyó y aportó de manera incondicional en el proyecto. Agradezco también al servicio de Medicina Interna del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, en particular a la Dra. Erika Karina Tenorio Aguirre, el Dr. Jesús Guillermo Mendoza García, por su apoyo incondicional, así como por fomentar el crecimiento académico y la formación de sus alumnos en el área de investigación, y al Dr. Juan Daniel Díaz García, compañero y amigo que siempre representó un apoyo fundamental no solo en el estudio de la maestría, sino también en el de la especialidad, y en la batalla de la pandemia por SARS-CoV2. Agradezco siempre a mi familia y amigos, en quienes he encontrado apoyo incondicional, paz y luz a través de este camino.

Contenido

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN	9
JUSTIFICACIÓN	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
OBJETIVO GENERAL	13
HIPÓTESIS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
Universo de estudio:.....	14
Población de estudio:	14
Tamaño de muestra:.....	14
CRITERIOS DE SELECCIÓN	16
Criterios de Inclusión de los Casos:.....	16
Criterios de exclusión de los Casos:	16
Criterios de Inclusión de los Controles:.....	16
Criterios de exclusión de los Controles:	17
PROCEDIMIENTOS	17
Descripción de los procedimientos:.....	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
CONSIDERACIONES ÉTICAS	19
RESULTADOS.....	20
Descripción general de la población	20
Descripción de la población según grupo de estudio	20
Distribución de alelos, genotipos y haplotipos del gen de IL10.....	22
Resultados obtenidos en la regresión logística multivariada.....	22
Desequilibrio de ligamiento (LD)	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN.....	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Normas de Vancouver)	26
ANEXOS.....	28
Cuadro 1.....	29
Cuadro 2.....	29

Cuadro 3..... 30
Cuadro 4..... 31
Cuadro 5..... 32
Cuadro 6..... 32
Cuadro 7..... 33
Cuadro 8..... 34
Cuadro 9..... 34
Cuadro 10..... 35
FIGURAS 36
Figura 1 36
Figura 2 38
ABREVIATURAS 39

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La retinopatía diabética (RD) es una complicación microvascular frecuente de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la causa más frecuente de ceguera no traumática en adultos americanos entre 20 y 74 años de edad. Es una enfermedad multifactorial con factores de riesgo genéticos y clínicos. Dentro de los factores genéticos se encuentra la interleucina (IL) -10, cuyos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se han asociado en otras poblaciones con la presencia de RD en pacientes con de DM2. La IL-10 es una citocina pleiotrópica anti-inflamatoria expresada por la mayoría de las células del sistema inmune innato y adaptativo (macrófagos, leucocitos y células dendríticas). Asimismo, la IL-10 puede inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias, impedir la presentación de antígenos y la proliferación de linfocitos T; así como estimular la proliferación, diferenciación y supervivencia de ciertas células del sistema inmune, como los linfocitos B. Tanto los niveles constitutivos como los niveles inducidos de IL-10 son regulados por variantes genéticas codificadas por el gen de la IL-10, principalmente por el polimorfismo -1082 A>G (rs1800896) en la región promotora del mismo. Sin embargo, los SNPs rs1800872 -592C>A, rs1800871 -819C>T, que también se localizan en la región promotora del gen, forman 3 haplotipos principales que se han encontrado asociados con distintas enfermedades inflamatorias, infecciosas y autoinmunes: GCC, ACC y ATA.

OBJETIVO: Determinar la asociación de los polimorfismos -1082, -819 y -592 del gen de la Interleucina 10 en pacientes con retinopatía diabética, ajustados a factores clínicos (tiempo de evolución de la DM, descontrol glucémico, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo y dislipidemia), en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se realizó un estudio de casos y controles, observacional, comparativo, transversal y ambispectivo. Se incluyeron a 201 sujetos de estudio, hombres y mujeres, de 30 a 90 ± 2 años de edad, 94 pacientes con diagnóstico de DM2 con RD y 107 pacientes con diagnóstico de DM2 sin RD, no pareados, atendidos en la consulta externa del Servicio de Medicina Interna, del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, de marzo a agosto de 2020, a quienes se les tomaron muestras de sangre periférica para la extracción del DNA genómico por el método de fenol/cloroformo y posterior genotipificación, con el sistema iPLEX Assay, con iniciadores específicos para la amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) de cada SNP y sondas alelo-específicas para la genotipificación final por espectrometría de masas.

RESULTADOS: La media aritmética de la edad para el grupo de casos fue de 58.27 años, mientras que para el grupo de controles fue de 54.04 años, con una media del tiempo en años de diagnóstico de la enfermedad para los casos de 13.51 años y para los controles de 13.59 años. El análisis por T de Student mostró asociación de la RD con la edad, el IMC, la hemoglobina glicosilada, la glucosa en ayuno y el LDL. Se estudiaron 3 polimorfismos del gen de *IL-10* (rs1800872, rs1800871, rs1800896). Los alelos silvestres fueron los más frecuentes en todos los grupos. Sólo el alelo rs1800896G se asoció con susceptibilidad a desarrollar RD ($p = 0.0005$; OR [95%CI] = 1.84 [1.18-2.87]). El análisis de los modelos de los genotipos mostró asociación del genotipo rs1800896G/G con susceptibilidad en el modelo codominante ($p = 0.0005$; OR [95%CI] = 11.82 [0.039-1.68E+6]), así como en el modelo recesivo ($p = 0.0006$; OR [95%CI] = 254.76 [0.33-1.02]); sin embargo, en ambos modelos el intervalo de confianza cruza la unidad. Sólo el SNP rs1800896G se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. El haplotipo CCG (rs1800872-rs1800871-rs1800896) se asoció con susceptibilidad ($p = 0.014$), mientras que el haplotipo CCG se asoció con protección ($p = 0.14$). El análisis de regresión logística multivariada, no condicionada, por pasos hacia atrás de Wald, mostró asociación con RD de las variables peso ($p = 1.56E-06$), IMC ($p = 0.025$), hipertensión ($p = 0.016$), hemoglobina glicosilada ($p = 0.009$), LDL ($p = 0.007$) y con el genotipo rs1800896AG ($p = 0.017$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN: Nuestro estudio mostró que el alelo rs1800896G y el genotipo rs1800896AG del gen de *IL-10* se asociaron con la presencia de RD en pacientes con diabetes tipo 2, indicando que podría representar un marcador importante en el desarrollo de esta complicación de la enfermedad. Con base en los resultados de este estudio, sugerimos que debe replicarse en diferentes áreas geográficas del país, con el fin de conocer las variaciones de frecuencia de estos polimorfismos en varias poblaciones. Los estudios de los SNPs asociados a la DM2 han cobrado fuerza a nivel mundial, esto es importante para la realización de estudios enfocados a explorar las asociaciones de estos con complicaciones de la enfermedad, ya que creemos que de esta manera se podrá contar con un grupo de polimorfismos que se puedan utilizar en un futuro cercano como una herramienta pronóstica en el control de esta patología.

PALABRAS CLAVE: IL-10; Diabetes tipo 2; Retinopatía diabética; Polimorfismo de un solo nucleótido.

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es la segunda causa de mortalidad (15.4%) en México de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2016, con un aumento progresivo de la misma desde el año 1980 (14,626 defunciones) hasta el año 2016 (105,574 defunciones) [1]. Asimismo, datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), en el año 2015 reportaron una prevalencia de DM2 en México de 15.9%, siendo ésta la más alta dentro de los miembros de dicha organización. En el mismo análisis, se identificó el inicio temprano de la DM2 en México (23.8% en personas de 40 a 59 años y 5.9% en personas de 20 a 39 años), el cual a su vez, fue el más frecuente dentro de los países miembros de la OCDE [2].

La retinopatía diabética (RD) es una complicación microvascular frecuente de la DM2 y la causa más frecuente de ceguera no traumática en adultos americanos entre 20 y 74 años de edad [3,4]. Múltiples estudios han reportado que la RD es una enfermedad multifactorial, cuyo desarrollo y progresión resulta de la interacción entre factores de riesgo genéticos y clínicos. A pesar de existir múltiples alteraciones metabólicas implicadas, el mecanismo exacto no se conoce. Entre los factores de riesgo clínicos para presentar retinopatía diabética se encuentran la duración de la diabetes, el control glicémico, la hipertensión concomitante y otros factores ambientales. Stratton et al., en el estudio UKPDS, reportó que una hemoglobina glucosilada (HbA1c) $\geq 7.5\%$ aumentó la incidencia de RD con un riesgo relativo (RR) = 2.5 y un intervalo de confianza (IC) = 2-3.2; asimismo, los pacientes con diagnóstico de RD y una HbA1c $\geq 7.5\%$ presentaron RR = 8.1 (IC = 6.3-10.5) de progresión de la RD. Con respecto a la hipertensión arterial sistémica, en el estudio UKPDS se observó que un aumento de la presión arterial sistólica se asoció significativamente con el aumento de la incidencia de RD ($p < 0.0001$); además de ello, una presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg se relacionó con un aumento de la incidencia con un riesgo relativo de 2.8 (IC = 2.2-3.5) [5].

En el cuadro 1 se muestran los factores de riesgo clínicos para el desarrollo y la progresión de RD y la fuerza de asociación descritos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) [6-9].

Diversos estudios clínicos y epidemiológicos han identificado un componente genético en la retinopatía diabética. Las variaciones a nivel genético pudieran explicar la presentación heterogénea de la misma [10]. Dentro del espectro de alteraciones implicadas en la retinopatía diabética, se encuentran la lesión en estructuras neurales y vasculares que culminan en cambios en la función de la retina. Es bien sabido que la hiperglicemia desencadena una serie de anormalidades y cambios metabólicos que producen daño retiniano, resultando en oclusión capilar, isquemia, aumento de la permeabilidad vascular, neurodegeneración y neovascularización [11].

Con respecto a la dislipidemia, Yau et al., realizaron una revisión sistemática en el año 2012 con el fin de determinar la prevalencia global y los factores de riesgo mayores para desarrollar retinopatía diabética [12]. Se extrajo información de 22,896 individuos con diabetes de 35 estudios de 1980 a 2008. Se observó que existía una tendencia al aumento de la prevalencia de retinopatía diabética que amenaza la visión con valores de colesterol total $\geq 154.6\text{mg/dL}$ (4mmol/L); con una prevalencia estandarizada por la edad de 8.09 (colesterol total $\leq 154.6\text{mg/dL}$) (IC 95% = 7.48-7.72) a 9.55 (colesterol total $\geq 154.6\text{mg/dL}$) (IC 95% = 9.42-9.69).

En el estudio ACCORD publicado por Chew y colaboradores, se analizaron los desenlaces oculares del tratamiento intensivo de la hiperglicemia, hipertensión arterial y dislipidemia en los 3,472 participantes. [13] En este estudio se encontró un beneficio estadísticamente significativo en los pacientes con tratamiento intensivo de la dislipidemia con los resultados que se presentan en el cuadro 2.

En el estudio ACCORD-lipid publicado por 5518 pacientes con DM2 fueron asignados aleatoriamente para recibir fenofibrato o placebo sumado al tratamiento con simvastatina 20 o 40mg al día. Los pacientes fueron seguidos en el tiempo durante un promedio de 4.7 años. En este estudio se comprobó que el tratamiento con fenofibrato para el control de la dislipidemia redujo la progresión de la retinopatía diabética en la examinación oftalmológica del fondo de ojo y en la necesidad de fotocoagulación con láser. [14]

En cuanto al tabaquismo como factor de riesgo para presentar retinopatía diabética en pacientes con DM2, en un meta-análisis publicado por Cai y colaboradores en 2018 [15] se incluyeron 73 estudios dentro de los cuales 19 estudios incluyeron pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) y 56 estudios incluyeron pacientes con DM2. Los resultados determinaron que en los pacientes con DM2, en comparación con pacientes no fumadores, el riesgo de RD disminuye significativamente en pacientes fumadores (RR = 0.92, IC95% = 0.86-0.98, $p=0.02$). Asimismo, el riesgo de presentar RD proliferativa disminuyó de manera significativa en pacientes fumadores (RR = 0.68, IC95% = 0.61-0.74, $p<0.001$).

Entre los diversos mecanismos que conforman la fisiopatología de la retinopatía diabética, se ha reconocido el papel de la inflamación como factor importante en el desarrollo de la misma. El daño retiniano produce una respuesta inmunológica que provoca una regulación positiva de mediadores pro-inflamatorios (moléculas de adhesión celular, citocinas, etcétera) que producen leucostasis y degradación de uniones celulares estrechas. Se ha descrito que puede existir sobreexpresión de citocinas en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética y que estas pueden estar implicadas en la patogénesis o fibrosis y angiogénesis de la enfermedad. [16] La interleucina (IL)-10 es una citocina pleiotrópica anti-inflamatoria expresada por la mayoría de las células del sistema inmune innato y adaptativo (macrófagos, leucocitos y células dendríticas). Asimismo, la IL-10 puede inhibir la producción de citocinas pro-

inflamatorias, impedir la presentación de antígenos y la proliferación de linfocitos T; así como estimular la proliferación, diferenciación y supervivencia de ciertas células del sistema inmune, como los linfocitos B. Tanto los niveles constitutivos como los niveles inducidos de IL-10 son regulados por variantes genéticas codificadas por el gen de la IL-10, principalmente por el polimorfismo -1082 A>G (rs1800896) en la región promotora del mismo. [3,17] Se piensa que ciertos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en la región promotora del gen de la IL-10 (rs1800872 -592C>A, rs1800871 -819C>T y rs1800896 -1082A>G), se encuentran asociados a diversas enfermedades inflamatorias, infecciosas o autoinmunes. Dichos polimorfismos forman tres principales haplotipos: GCC, ACC y ATA. Los haplotipos GCC y ATA, los cuales están asociados con los niveles séricos de IL-10, se han correlacionado con alta y baja actividad transcripcional, respectivamente. [18]

Se han realizado múltiples estudios con el fin de identificar la asociación de dichos polimorfismos con el desarrollo de DM2 en adultos, así como con el desarrollo de sus complicaciones. Algunos estudios han determinado la relación del polimorfismo -1082 A>G (rs1800896) del gen de la IL-10 con el desarrollo de enfermedad renal crónica terminal y neuropatía periférica, como complicaciones de la diabetes. También se ha demostrado que la disfunción inmune e inflamación excesiva, están implicadas en la patogénesis de la DM2. [19] Sin embargo, pocos estudios han investigado la relación del polimorfismo -1082 A>G del gen de la IL-10 con el desarrollo de la retinopatía diabética. Da Silva y colaboradores realizaron una investigación con el objetivo de determinar si el polimorfismo -1082 A>G del gen de la IL-10 se asocia con retinopatía diabética en población brasileña con DM2, encontrando que el genotipo -1082AA se asociaba con el desarrollo de retinopatía diabética no proliferativa, mientras que el genotipo -1082GG se asociaba con retinopatía diabética proliferativa. Esto fue consistente con estudios previos realizados en población caucásica y asiática. [3] Además de ello, en los últimos años se ha observado que los pacientes y animales de experimentación que padecen DM2 cuentan con una secreción inadecuada de IL-10 (disminución significativa de su concentración sérica) y que el polimorfismo -592 del gen de la IL-10 se encuentra íntimamente relacionado con el desarrollo de DM2. Por ello, Dong y colaboradores estudiaron la relación de los niveles séricos de IL-10 y el polimorfismo -592 del gen de la IL-10 con la retinopatía diabética en animales de experimentación. Se concluyó que la presencia de dicho polimorfismo se encuentra relacionada con el desarrollo de retinopatía diabética. [20] Asimismo, Paine y colaboradores estudiaron la asociación de los polimorfismos IL-10, IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF) α con el desarrollo de retinopatía diabética proliferativa en pacientes con DM2. Los resultados mostraron que los genotipos de IL-10: -1082GG (P = 0.0037; odds ratio [OR] = 2.232) y de TNF α -238AA (P = 0.0001; OR = 5.791) y -238GA (P = 0.0015; OR = 1.909) se asociaron significativamente con la presencia de retinopatía diabética proliferativa. El alelo -1082G (P = 0,0048, OR = 1,4442) de IL-10 y el alelo -238A (P = 0.0001; OR = 2.2897) del TNF α aumentaron significativamente entre los casos de retinopatía diabética proliferativa en población Hindú. [21]

Shu y colaboradores realizaron un meta-análisis con el fin de determinar el papel de los polimorfismos del gen de la IL-10 en la DM2 y sus complicaciones asociadas (nefropatía y retinopatía diabética). Incluyeron 32 estudios en el análisis y detectaron asociaciones significativas de los polimorfismos rs1800871 (-819 C>T), rs1800872 (-592 C>A) y rs1800896 (-1082 A>G) con el riesgo de presentar DM2. Con respecto a la retinopatía, se encontró que el polimorfismo rs1800896 se correlacionó de una manera significativa con el riesgo de presentar retinopatía diabética en pacientes con DM2 ($p=0.04$, OR=1.27 Intervalo de confianza (IC 95%)=1.01-1.59). [19]

En el cuadro 3 se muestra la evidencia donde se desglosa la bibliografía existente que asocia los polimorfismos del gen de la IL-10 con el desarrollo y progresión de la retinopatía diabética:

Con respecto al estudio de los polimorfismos mencionados en nuestra población, Vázquez y colaboradores, investigaron la frecuencia y distribución de los haplotipos -1082 A>G, -819 C>T y -592 C>A de la IL-10 en población mexicana. Los resultados obtenidos demuestran que la población del occidente del país presenta una frecuencia incrementada del genotipo -1082AA (50%) y del alelo -1082A (70%). Además, se encontró que los haplotipos ACC (45.4%), ATA (22%) y GTA (14.9%) fueron los más frecuentes dentro de la población estudiada. No se encontraron diferencias del genotipo y la frecuencia alélica de los polimorfismos -819 C>T y -592 C>A en la población del centro y occidente del país. [18]

Debido a que dicha evidencia bibliográfica ha apoyado que el gen de la IL-10 está implicado en la fisiopatología de la retinopatía diabética, resulta de vital importancia continuar con la investigación de dicha asociación en población con alta prevalencia de la DM2, como lo es la nuestra.

JUSTIFICACIÓN

La DM2 y sus complicaciones son causas primarias de muerte y discapacidad en México y a nivel mundial. Según datos de la OCDE 2015 mencionados anteriormente, la prevalencia de DM2 en México resultó ser la más alta de los países incluidos en el análisis. Además de ello, se observó que México cuenta con el inicio más temprano de la Diabetes. La retinopatía diabética es una complicación microvascular frecuente en pacientes con DM2. Asimismo, es la causa más frecuente de ceguera no traumática en adultos americanos entre 20 y 74 años. Debido a lo anterior, resulta fundamental realizar el protocolo presente ya que incide directamente en uno de los problemas de Salud Pública más importantes de México además de que pudiera ser la base para próximas investigaciones y desarrollo de nuevas terapias.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los polimorfismos -1082, -819 y -592 del gen de la Interleucina-10, ajustados a factores clínicos (tiempo de evolución de la DM, descontrol glucémico, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo y dislipidemia), estarán asociados con la presencia de retinopatía diabética en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2?

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de los polimorfismos -1082, -819 y -592 del gen de la Interleucina 10 en pacientes con retinopatía diabética, ajustados a factores clínicos (tiempo de evolución de la DM, descontrol glucémico, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo y dislipidemia), en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Calcular la asociación de los polimorfismos de IL-10 con la retinopatía diabética.
2. Tipificar los polimorfismos -1082, -819 y -592 del gen de la Interleucina-10 en pacientes con y sin retinopatía diabética y Diabetes Mellitus tipo 2.
3. Identificar la frecuencia de los polimorfismos -1082, -819 y -592 del gen de la Interleucina-10 en pacientes con retinopatía diabética y en los pacientes sin retinopatía diabética.

HIPÓTESIS

Si los polimorfismos -1082, -819 y -592 del gen de la interleucina-10 están asociados con retinopatía diabética, ajustando con factores clínicos, entonces la frecuencia de los polimorfismos estará incrementada significativamente en los que presentan retinopatía en comparación con los que no la presentan.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio epidemiológico de diseño de casos y controles.

Se incluyeron 201 sujetos, 94 pacientes con diagnóstico de DM2 con RD y 107 pacientes con diagnóstico de DM2 sin RD.

Universo de estudio:

Pacientes adultos mexicanos de 30 a 90 ± 2 años de edad con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2, que acudieron al Servicio de Medicina Interna del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

Población de estudio:

Pacientes adultos mexicanos de 30 a 90 ± 2 años de edad con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 con y sin retinopatía diabética que acudieron al Servicio de Medicina Interna y Oftalmología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de enero a julio de 2020.

La definición de los grupos de estudio se presenta a continuación:

Casos: Pacientes adultos mexicanos de 30 a 90 ± 2 años de edad con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 y retinopatía diabética que acudieron al Servicio de Medicina Interna y al Servicio de Oftalmología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de enero a julio de 2020.

Controles: Pacientes adultos mexicanos de 30 a 90 ± 2 años de edad con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2, sin retinopatía diabética, que acudieron al Servicio de Medicina Interna y al Servicio de Oftalmología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de enero a julio de 2020.

Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra se calculó con el software Epidat versión 4.2 (<https://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT>). Para nuestro estudio se calculó un tamaño de muestra para casos y controles.

Los factores que intervienen en el cálculo son:

1. Proporción de casos expuestos o frecuencia de la exposición en los casos (P1).
2. Proporción de controles expuestos o frecuencia de la exposición en los controles (P2).
3. Relación de momios a detectar (Odds ratio, OR).

Estos tres valores están relacionados entre sí del modo siguiente:

$$P_1 = \frac{OR P_2}{(1-P_2)+OR P_2}, P_2 = \frac{P_1}{OR(1-P_1)+P_1}.$$

La expresión queda finalmente así:

$$OR = \frac{P_1(1-P_2)}{P_2(1-P_1)},$$

por lo que, especificando dos de estos parámetros, el otro queda perfectamente determinado. Epidat 4.2 permite que el usuario decida cuál pareja de valores desea introducir y calcula automáticamente el tercero.

También tiene que incluirse la seguridad con la que se desea trabajar (α), o riesgo de cometer un error de tipo I. En este caso se trabajó con una seguridad del 95% ($\alpha = 0.05$). El poder estadístico ($1-\beta$) que se quiere para el estudio, o riesgo de cometer un error de tipo II. $\beta = 0.2$, es decir, un poder del 80%.

Con estos datos y, para un planteamiento bilateral, para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la expresión

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

donde $p=p_1+p_2/2$ y los valores $Z_{1-\alpha/2}$ y $Z_{1-\beta}$ son valores que se obtienen de la distribución normal estándar en función de la seguridad y el poder elegidos para el estudio. En particular, para una seguridad de un 95% y un poder estadístico del 80% se tiene que $Z_{1-\alpha/2}= 1.96$ y $Z_{1-\beta}= 0.84$.

Tomando en cuentas esta información y la incidencia de los SNP en diversas poblaciones (ver marco teórico) se calculó el tamaño de muestra para la población de estudio con los siguientes parámetros:

Proporción de casos expuestos	60%
Odds ratio a detectar	2
Nivel de confianza	95%
Resultados	
Potencia	80%
Número de Pares	135

Se realizó el cálculo con Epidat 4.2 para muestras independientes, no pareadas. El tipo de muestreo que se incluirá en el estudio fue probabilístico aleatorio simple, tanto para los casos

como para los controles, a través de la generación de números al azar por medio de un software (Microsoft Excel).

Es importante mencionar que debido a la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19) no se consiguió completar el tamaño de muestra calculado, sin embargo, este estudio se logró realizar con 107 controles y 94 casos, siendo un total de 201 sujetos de estudio.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de Inclusión de los Casos:

Se incluyeron pacientes con DM2 con retinopatía diabética que acudieron a la consulta externa del Servicio de Medicina Interna y del Servicio de Oftalmología con las siguientes características:

- Hombres y mujeres mexicanos
- De 30 a 90 ± 2 años de edad
- Diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 de acuerdo con las guías de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, American Diabetes Association por sus siglas en inglés)
- Criterios de clasificación de la Academia Americana de Oftalmología de RD proliferativa o no proliferativa (AAO, American Academy of Ophthalmology por sus siglas en inglés)
- De enero a julio de 2020.

Criterios de exclusión de los Casos:

- Edema corneal de cualquier causa
- Enfermedades inflamatorias del segmento anterior del ojo:
 - Uveitis de cualquier etiología
 - Glaucoma neovascular
- Sinequias posteriores periféricas
- Catarata LOCS III NO6NC6
- Hemorragia vítrea
- Oclusión de vena central de la retina (o de rama)

Criterios de Inclusión de los Controles:

Se incluyeron pacientes con DM2 sin retinopatía diabética del Servicio de Medicina Interna y del Servicio de Oftalmología con las siguientes características:

- Hombres y mujeres mexicanos

- De 30 a 90 ± 2 años de edad
- Diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 de acuerdo con las guías de la Asociación Americana de Diabetes (ADA)
- De enero a julio de 2020.

Criterios de exclusión de los Controles:

- Edema corneal de cualquier causa
- Enfermedades inflamatorias del segmento anterior del ojo:
 - Uveitis de cualquier etiología
 - Glaucoma neovascular
- Sinequias posteriores periféricas
- Catarata LOCS III NO6NC6
- Hemorragia vítrea
- Oclusión de vena central de la retina (o de rama)

PROCEDIMIENTOS

Descripción de los procedimientos:

1. Se seleccionaron pacientes que cumplieron con criterios diagnósticos de DM2, de ellos se incluyeron aquellos que cumplieron con criterios de RD (casos) y aquellos que no tuvieron RD (controles), que acudieron a la Consulta Externa de Medicina Interna de enero a julio de 2020.
2. Fueron invitados a participar en el proyecto de investigación y después de la explicación pertinente del estudio a realizar, firmaron la carta de consentimiento informado.
3. Se les tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica por venopunción en el antebrazo después de un ayuno de 12 a 14 horas (tubo con anticoagulante el EDTA-Na al 15 %). Los pacientes fueron reclutados en el primer piso del edificio de especialidades (correspondiente a la Consulta Externa de Medicina Interna).

4. En el Expediente Clínico de los pacientes seleccionados se determinó: tiempo de evolución de la DM2, control glucémico, control tensional, presencia de dislipidemia y tabaquismo, en el año previo a la inclusión en el estudio.
5. De la muestra de sangre periférica obtenida, se realizó la extracción del DNA genómico en el Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. El DNA se purificó por el método del fenol/cloroformo alcohol isoamílico. Se cuantificó y verificó la pureza del DNA mediante espectrofotometría (espectrofotómetro Nanodrop) a 260, 240 y 280 nm.
6. La genotipificación se realizó con el sistema iPLEX Assay acoplado al MassARRAY de la compañía Agena Bioscience. Con el fin de diseñar el multiplex óptimo para la amplificación de los diferentes polimorfismos de interés, se utilizó el software TYPER Assay Designer con los siguientes parámetros de diseño: tamaño de primers entre 15 a 30 nucleótidos, tamaño promedio de los amplicones de entre 80 y 120 pares de bases (pb), temperatura de alineamiento de 45°C, robustez óptima de 1 en formación de bucles, dímeros y falsos primers de amplificación y extensión, rango de espectrometría de 4.3 a 9 kDa, distancia de separación entre SNPs de 30 Da.
7. Se utilizó la hoja de cálculo iPLEX Mastermix Calculator.xlsx para establecer la cantidad de MasterMix a usar en las reacciones de PCR, SAP y PCR de Extensión, dependiendo de la cantidad de muestras a procesar (Usando un 10 % extra de excedente).
8. Finalmente, los SNPs amplificados se transfirieron al sistema MassARRAY y, mediante espectrometría de masas, fue detectado cada uno de los alelos de los SNPs. Este sistema analiza los datos y reporta de manera automática los genotipos encontrados para cada una de las muestras utilizadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias de los polimorfismos se obtuvieron mediante conteo directo y se compararon entre los pacientes con y sin retinopatía diabética. Se efectuó un análisis

univariado, bivariado y posteriormente un análisis multivariado, ajustando el efecto del polimorfismo con el tiempo de evolución de la DM2, control glucémico, control tensional, presencia de dislipidemia y tabaquismo. Dentro de las medidas de asociación, se calculó la razón de momios (OR, por sus siglas en inglés Odds Ratio) mediante regresión logística. Se obtuvo también el intervalo de confianza 95% (IC95%). Los cálculos se llevaron a cabo usando los programas SPSS v20 y EpiInfo v6.1.

Análisis Univariado: Para variables cualitativas se realizó descripción de proporciones (porcentajes). Para variables cuantitativas se describió media, intervalo de confianza de la media, mediana y desviación estándar. Se utilizaron gráficos de sectores y box plot.

Análisis Bivariado: Para las variables cualitativas se realizó un análisis con cada una de las variables dicotómicas en función de la variable dependiente, utilizando comparación de proporciones. Se calculó la X^2 de Pearson y se observó que cumpliera el supuesto de los valores esperados (≤ 0.05). Con las variables cuantitativas, con relación a la variable dependiente, se realizó comparación de medias con la prueba T de Student y Fisher y se reportó la diferencia de la media aritmética con su respectivo IC al 95%. El supuesto de simetría se comprobó con la prueba de Kolmogorov smirnov (muestra grande). Para probar homogeneidad de varianzas se utilizó el estadístico de Levene.

Análisis Multivariado: Se analizaron todas las variables (cualitativas o cuantitativas) que tuvieron un nivel de significancia cuya p fue ≤ 0.05 mediante un modelo de regresión logística no condicionada, por el método introducir. Los resultados fueron analizados a través coeficiente B, exponenciado, para obtener la Odds Ratio (Razón de Momios) e intervalo de confianza al 95%; el nivel de significancia fue analizado a través del estadístico de Wald.

Los haplotipos y bloques de desequilibrio de ligamiento (LD) fueron generados con el programa Haploview (v4.2). El programa en línea que se utilizó para establecer el modelo más informativo de asociación mendeliana (dominante, codominante, recesivo, sobre dominante o aditivo logarítmico) fue SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>). Se probaron las frecuencias de los genotipos para cada SNP para detectar posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg usando la prueba X^2 con 1 grado de libertad.

Los análisis bivariado y multivariado se realizaron utilizando el programa SPSS v20 con IC 95%.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los pacientes que participaron en este protocolo firmaron una carta de consentimiento informado.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y por el Comité de Investigación con el número de registro 12-21-2020.

RESULTADOS

Descripción general de la población

Participaron en el estudio un total de 201 pacientes, que se dividieron en dos grupos, 94 casos (con diagnóstico de diabetes tipo 2 y presencia de retinopatía diabética) y 107 controles (con diagnóstico de diabetes tipo 2 y sin presencia de retinopatía diabética).

La media aritmética de la edad para el grupo de casos fue de 58.27 años (IC 95% 55.72 a 60.81), mientras que para el grupo de controles fue de 54.04 años (IC 95% 51.30 a 56.78), con una media del tiempo en años de diagnóstico de la DM2 para los casos de 13.51 años (IC 95% 12.49 a 14.53) y para los controles de 13.59 años (IC 95% 11.01 a 16.16). La media del IMC fue de 28.31 kg/m² (IC 95% 27.48 a 29.13) en los casos y de 25.39 kg/m² (IC 95% 24.69 a 26.09) en los controles.

Con relación a la variable de control glucémico compuesta por la HbA1c y la glucosa en ayunas, los casos presentaron una media de HbA1c de 9.18% (IC 95% 8.77 a 9.60) y los controles de 8.02% (IC 95% 7.58 a 8.46) y de glucosa en ayunas: casos 154.30 mg/dl (IC 95% 153.48 a 155.12); controles 135.73 mg/dl (IC 95% 131.18 a 140.28).

Con respecto al perfil lipídico, los casos presentaron una media de LDL de 85.91 mg/dl (IC 95% 80.27 a 91.56), HDL de 43.18 mg/dl (IC 95% 40.66 a 45.70) y triglicéridos de 186.67 mg/dl (IC 95% 158.61 a 214.74), mientras que los controles presentaron una media de LDL de 100.29 mg/dl (IC 95% 95.04 a 105.54), HDL de 42.87 mg/dl (IC 95% 41.33 a 44.41) y triglicéridos de 207.75 mg/dl (IC 95% 191.13 a 224.37). Por último, con relación al tiempo de diagnóstico de la retinopatía diabética, la media fue de 5.61 años (IC95% 5.05 a 6.16) (Cuadro 4).

Descripción de la población según grupo de estudio

De acuerdo a las características clínicas de los pacientes según el grupo de estudio, se llevó a cabo un análisis bivariado con las variables cuantitativas en relación con la variable dependiente, en el que se compararon las medias con la prueba T de Student (Cuadro 4), donde se encontró que la media aritmética en años de los casos fue mayor, 58.27 años, en comparación con los controles, 54.04 años, siendo estadísticamente significativa ($p= 0.029$) tal como se muestra en el box plot (Figura 1A), presentando no igualdad de varianzas utilizando el estadístico de Levene con un nivel de significancia de 0.01.

En cuanto al tiempo de evolución de la enfermedad, la media aritmética de los casos en años fue de 13.51 y de controles de 13.59, siendo mayor en controles ($p= 0.92$), presentando igualdad de varianzas con un nivel de significancia de 0.06 (Figura 1B).

Con relación al IMC este fue mayor en el grupo de casos 28.31, que en el grupo control 25.39 con un valor $p= 2.73E-07$, presentando homogeneidad de varianzas, nivel de significancia 0.31 (Figura 1C). En el control glucémico, la hemoglobina glucosilada fue mayor en el grupo de casos que en el grupo control (9.18 vs 8.02) $p=0.001$, probando igualdad de varianzas por la prueba de Levene (0.17) (Figura 1D), la glucosa en ayunas fue también mayor en el grupo de casos que en el grupo control (154.30 vs 135.73), siendo estadísticamente significativo con una $p= 1.53E-05$ sin mostrar homogeneidad de varianzas (0.004) (Figura 1E).

En el perfil lipídico, se evaluó el LDL en casos y controles presentando una media aritmética mayor en este último grupo (85.91 vs 100.29) con un valor $p= 3.28E-04$ y mostrando igualdad de varianzas (0.62) (Figura 1F).

El HDL fue mayor en el grupo de casos con respecto al grupo control (43.18 vs 42.87) $p=0.83$, sin mostrar homogeneidad de varianzas (0.01) (Figura 1G) y los triglicéridos en ambos grupos estuvieron elevados, siendo menor en el grupo de casos con respecto a los controles (186.67 vs 207.75) $p= 0.19$, presentando homogeneidad de varianzas utilizando el estadístico de Levene con un nivel de significancia de 0.06 (Figura H).

El supuesto de simetría fue realizado por la prueba de Kolmogorov-Smirnov al ser una muestra grande, sin presentar cada una de las variables estudiadas una distribución normal.

De igual manera, se llevó a cabo un análisis bivariado con las variables cualitativas, donde se realizó un análisis con todas las variables dicotómicas en función de la variable dependiente utilizando la comparación de proporciones, donde se calculó la X^2 de Pearson y se observó que cumplieran el supuesto de los valores esperados (igual o mayor a 5) (Cuadro 5), encontrándose que con respecto a la variable sexo, predominaron los hombres en ambos grupos, el 70.2% (66) en casos y el 57.0% (61) en controles con $p=0.053$.

Con relación al antecedente de hipertensión arterial sistémica fue mayor en el grupo de casos 58.5% (55) a comparación del grupo control 32.7% (35), representando una variable estadísticamente significativa ($p=2.42E-04$). En cuanto al tabaquismo, se encontró que hubo una frecuencia más alta en los casos 46.8% (44) que en los controles 30.8% (33), resultando una diferencia significativa ($p=0.020$).

Distribución de alelos, genotipos y haplotipos del gen de IL10.

Se estudiaron 3 polimorfismos del gen de *IL-10* (rs1800872, rs1800871, rs1800896) que se muestran en el Cuadro 6. La asociación de los alelos y los genotipos en la población estudiada con DM2, tanto en los controles como en los casos, se muestra en el cuadro 7.

Los alelos silvestres fueron los más frecuentes en todos los grupos. Sólo el alelo rs1800896G se asoció con susceptibilidad a desarrollar retinopatía diabética ($p = 0.007$; OR [95%CI] = 1.84 [1.18-2.87]).

El análisis de los modelos de los genotipos mostró asociación del genotipo rs1800896G/G con susceptibilidad en el modelo codominante ($p = 0.0005$; OR [95%CI] = 11.82 [0.039-1.68E+6]), así como en el modelo recesivo ($p = 0.0006$; OR [95%CI] = 254.76 [0.33-1.02]); sin embargo, en ambos modelos el intervalo de confianza cruza la unidad. Sólo el SNP rs1800896 se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. La tasa de éxito general de la técnica de tipificación fue del 98.9%.

El software Haploview v4.2 estableció 3 haplotipos de los polimorfismos analizados de IL10 (Cuadro 8), uno de los cuales, CCG (rs1800872-rs1800871-rs1800896), se asoció con susceptibilidad ($p = 0.014$; OR [95%CI] = 1.75 [1.12-2.74]), mientras que el haplotipo CCA fue de protección ($p = 0.003$; OR [95%CI] = 0.52 [0.33-0.80]).

Resultados obtenidos en la regresión logística multivariada

Se realizó un análisis de regresión logística multivariada, no condicionada, por el método introducir, donde se incluyeron las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis bivariado: Edad (años), IMC (kg/m²), Peso (Kg), Hemoglobina Glicosilada (%), Glucosa en ayunas (mg/dL), LDL (mg/dL), Hipertensión (presente, ausente), Tabaquismo (presente, ausente), rs1800896 (A/A, A/G, G/G). Los resultados con significancia estadística se muestran en el cuadro 9.

Finalmente, se llevó a cabo la regresión logística multivariada, no condicionada, por pasos hacia atrás (Wald), cuyos resultados se presentan en el cuadro 10.

Desequilibrio de ligamiento (LD)

El gráfico generado en Haploview (v4.2) para determinar el LD (D') para los 3 SNPs de IL10 se presenta en la Figura 2, en el que se observa un fuerte LD entre los 3 SNPs.

DISCUSIÓN

La RD es una de las complicaciones más comunes y graves de la DM2, los mecanismos involucrados en el desarrollo de la RD son: secreción anormal de metaloproteinasas de matriz, daño vascular endotelial producido por inflamación y estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, modificación epigenética y trastornos en las células progenitoras del endotelio vascular [19].

La incidencia y los procesos de desarrollo de la RD suelen ir acompañados de agregación e infiltración de leucocitos en el área de la lesión y, al mismo tiempo, la estimulación elevada de glucosa puede desencadenar la secreción de una gran cantidad de factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa, varias interleucinas, factores de crecimiento del endotelio vascular, factores derivados del epitelio pigmentario, ciclooxigenasas, óxido nítrico y una variedad de moléculas de adhesión generadas por estas células inflamatorias. [23,24]

La IL-10 es un miembro vital de la familia de las interleucinas, que inhibe la adhesión e infiltración de diversas células inflamatorias, así como la liberación de diversas citocinas proinflamatorias por parte de monocitos y macrófagos, para finalmente ejercer un efecto antiinflamatorio. El polimorfismo de IL-10 tiene correlación con la incidencia, desarrollo y pronóstico de diversas enfermedades.

Por ejemplo, los pacientes con el virus de la hepatitis B con genotipo del alelo C en -592 en la región promotora del gen IL-10 pueden poseer una capacidad más fuerte para eliminar el VHB. [25]

Adicionalmente, la aparición y el desarrollo de cirrosis después de la infección por VHB también se ven directamente afectados por polimorfismos en los loci -592, -819 y -1082 en la región promotora. [26]

Además, los genotipos -592A/A y -819T/T de la región promotora del gen IL-10 pueden tener correlaciones con el desarrollo y exacerbación de los síndromes de intestino irritable que producen diarrea. [27]

En este trabajo se han investigado de forma importante los factores clínicos que influyen y representan un factor de riesgo para la aparición de RD en pacientes diabéticos, dentro de las principales se encuentran: edad, tiempo de evolución de la enfermedad, descontrol glucémico (definido por una hemoglobina glucosilada >7% en un período de tres meses y glucosa en ayunas >130 mg/dL), índice de masa corporal (sobrepeso y obesidad) e hipertensión arterial sistémica, así como los SNPs -592, -819 y -1082 de la región promotora del gen de IL-10.

El análisis por T de Student muestra que la edad, el IMC, la hemoglobina glicosilada, la glucosa en ayuno y el LDL están asociados con la RD. Sin embargo, en el estudio de Rodrigues et al., solo encuentran asociados la edad y la glucosa postprandial (que no se midió en el presente estudio), pero es contraria la asociación del IMC, ya que ellos encuentran un menor valor en los pacientes que tienen RD y nosotros lo encontramos más elevado que en los que no presentan RD. [28]

El análisis por X^2 de Pearson no mostró asociación con el sexo de los pacientes, pero sí con la presencia de retinopatía diabética, difiriendo con el estudio de Rodrigues et al.

Con respecto a los polimorfismos del gen de IL-10, nuestros resultados concuerdan parcialmente con los de Paine et al. [21], ya que, mientras el alelo rs1800896G se encontró asociado a RD, el genotipo rs1800896GG, en su forma codominante y recesiva, tiene una p significativa, pero los intervalos de confianza cruzan la unidad, de manera que se podría hablar sólo de una tendencia de asociación.

Igualmente, Cilensek et al., encontró en el análisis de regresión logística el genotipo IL-10 rs1800896GG como un factor de riesgo independiente para la RD proliferativa, pero ninguno de los alelos o genotipos en el análisis univariado [29]. Sin embargo, el análisis de regresión logística de nuestros datos mostró que el genotipo asociado a RD fue rs1800896AG, lo cual difiere de los resultados de los otros autores.

Contrariamente, el alelo 1800896A mostró asociación con protección a RD, mientras que sólo se presentó una tendencia de asociación del genotipo 1800896AA en los modelos codominante y dominante, debido nuevamente a que los intervalos de confianza cruzan la unidad, aunque la p sea significativa. No obstante, los haplotipos CCG y CCA mostraron asociación con susceptibilidad y protección, respectivamente, lo cual confirma la importancia del polimorfismo 1800896, ya que es el único que se modifica en estos haplotipos.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Acorde a la Declaración GRADE [30], para analizar y evaluar el riesgo de sesgo, es necesario discutir los siguientes conceptos.

Factores que pueden disminuir la calidad de la evidencia

Limitaciones en el diseño y ejecución (riesgo de sesgo): Al ser un estudio observacional los factores que limitarían la confianza (calidad) en los resultados serían: criterios inapropiados de selección de la población, medidas de exposición o desenlace inapropiadas, control inadecuado de los factores de confusión o seguimiento incompleto de los pacientes. Como la población fue seleccionada adecuadamente y los siguientes parámetros fueron controlados, consideramos

que los factores de confusión pudieron no haber sido controlados adecuadamente y esto nos daría un riesgo de sesgo.

Inconsistencia de los resultados: Los trabajos publicados sobre el tema son de poblaciones diferentes a la nuestra, por lo que hay diferencias en los resultados, pudiendo presentarse riesgos de sesgo.

Ausencia de evidencia directa: No hay trabajos similares en nuestra población.

Imprecisión. Para aumentar la calidad de las observaciones se requiere incrementar el tamaño de la muestra.

Sesgo de publicación: Dado que se cuenta con muy pocos estudios con los que se pueden comparar nuestros resultados, se podría decir que existe un sesgo de publicación, ya que podría haber estudios no publicados con resultados contrarios a los nuestros.

CONCLUSIÓN

IMPLICACIONES PARA LA PRÁCTICA MÉDICA

Este estudio mostró que el alelo rs1800896G y el genotipo rs1800896AG del gen de IL-10 se asociaron con la presencia de RD en pacientes con diabetes tipo 2, indicando que podría representar un marcador importante en el desarrollo de esta complicación de la enfermedad.

IMPLICACIONES PARA LAS DIRECCIONES FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Con base en los resultados de este estudio, sugerimos que debe replicarse en diferentes áreas geográficas del país, con el fin de conocer las variaciones de frecuencia de estos polimorfismos en varias poblaciones. Los estudios de los SNPs asociados a la DM2 han cobrado fuerza a nivel mundial, esto es importante para la realización de estudios enfocados a explorar las asociaciones de estos con complicaciones de la enfermedad, ya que creemos que de esta manera se podrá contar con un grupo de polimorfismos que se puedan utilizar en un futuro cercano como una herramienta pronóstica en el control de esta patología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Normas de Vancouver)

1. INEGI. Mortalidad general (Internet). 2016 (citado el 8 de mayo de 2023). Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/Proyectos/bd/continuas/mortalidad/MortalidadGeneral.asp>
2. Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care. OCDE 2015.
3. Da Silva Pereira BL, Regina PE, Crispim D, et al. Interleukin-10 -1082A>G (rs1800896) polymorphism is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2018; 138:187-192.
4. Cho H, Sobrin L. Genetics of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2014; 14(8):515.
5. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, et al. UKPDS 50: Risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 2001;44(2):156-163.
6. Solomon SD, Chew E, Duh EJ, et al. Diabetic Retinopathy: a Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2017; 40(3):412-418.
7. Xu J, Xu L, Wang YX, et al. Ten-year cumulative incidence of diabetic retinopathy. The Beijing Eye Study 2001/2011. *PLoS One* 2014;9(10):e111320.
8. Kajiwara A, Miyagawa H, Saruwatari J, et al. Gender differences in the incidence and progression of diabetic retinopathy among Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a clinic-based retrospective longitudinal study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(3):e7-10.
9. Jin P, Peng J, Zou H, et al. The 5-year onset and regression of diabetic retinopathy in Chinese type 2 diabetes patients. *PLoS One*. 2014;9(11):e113359.
10. Priščáková P, Minárik G, Repiská V. Candidate gene studies of diabetic retinopathy in human. *Mol Biol Rep* 2016;43:1327-45.
11. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010;376:124-36.
12. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 2012;35(3):556-564.
13. Chew EY, Davis MD, Danis RP, et al. The Effects of Medical Management on the Progression of Diabetic Retinopathy in Persons with Type 2 Diabetes. The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Eye Study. *Ophthalmology* 2014;121(12):2443-2451.
14. Elam M, Lovato L, Ginsberg H. The ACCORD-Lipid study: implications for treatment of dyslipidemia in Type 2 diabetes mellitus. *Clin Lipidol* 2015;6(1):9-20.
15. Cai X, Chen Y, Gao X, et al. The association of smoking and risk of diabetic retinopathy in patients with type 1 and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Endocrine* 2018;62(2):299-306.
16. Abu El-Asrar AM, Imtiaz Nawaz M, Kangave D, et al. Osteopontin and other regulators of angiogenesis and fibrogenesis in the vitreous from patients with proliferative vitreoretinal disorders. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:493043.
17. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, et al. Interleukin-10 paradox: a potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* 2015;74:27-34.
18. Vázquez M, Palafox CA, Hernández J, et al. Frequency distribution of interleukin-10 haplotypes (-1082 A>G, -819 C>T, and -592 C>A) in a Mexican population. *Genet Mol Res* 2016; 15(4).
19. Shu Y, Chen Y, Luo H, et al. The Roles of IL-10 Gene Polymorphisms in Diabetes Mellitus and Their Associated Complications: A Meta-Analysis. *Horm Metab Res* 2018; 50(11):811-815.
20. Dong H, Li Q, Wang M, et al. Association Between IL-10 Gene Polymorphism and Diabetic Retinopathy. *Med Sci Monti* 2015; 21:3203-08.

21. Paine SK, Sen A, Choudhuri S, et al. Association of Tumor Necrosis Factor α , Interleukin 6 and Interleukin 10 Promoter Polymorphism with Proliferative Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetic Subjects. *Retina* 2012; 32(6):1197-1203.
22. Shi YL, Shi MY, Yin LZ, et al. IL-10 gene polymorphism in diabetic retinopathy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23(12):5059-5064.
23. Capitão M, Soares R. Angiogenesis and inflammation crosstalk in diabetic retinopathy. *J Cell Biochem*. 2016;117(11):2443-53.
24. Jiang T, Chang Q, Cai J, et al. Protective effects of melatonin on retinal inflammation and oxidative stress in experimental diabetic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3528274.
25. Ahmadabadi BN, Hassanshahi G, Arababadi MK, et al. The IL-10 promoter polymorphism at position -592 is correlated with susceptibility to occult HBV infection. *Inflammation*. 2012;35(3):818-21.
26. Yan Z, Tan W, Zhao W, et al. Regulatory polymorphisms in the IL-10 gene promoter and HBV-related acute liver failure in the Chinese population. *J Viral Hepat*. 2009;16(11):775-83.
27. Olivo-Díaz A, Romero-Valdovinos M, Gudiño-Ramírez A, et al. Findings related to IL-8 and IL-10 gene polymorphisms in a Mexican patient population with irritable bowel syndrome infected with *Blastocystis*. *Parasitol Res*. 2012;111(1):487-91.
28. Rodrigues KF, Pietrani NT, Sandrim VC, et al. Association of a large panel of cytokine gene polymorphisms with complications and comorbidities in type 2 diabetes patients. *J Diabetes Res*. 2015;2015:605965.
29. Cilensek I, Hercegovac A, Starcevic J, et al. Polymorphisms of interleukin-4, -10 and 12B genes and diabetic retinopathy. *Open Life Sci*. 2011, 6.
30. Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction-GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol*. 2011, 64(4):383-94.

ANEXOS

Cuadro 1. Factores de riesgo clínicos asociados con la progresión de la retinopatía diabética.

Factor de Riesgo	Referencia	Fuerza de asociación, OR (IC95%)
Duración de la DM	Xu et al. [7]	1.16 (1.10-1.22) incremento anual
	Kajiwara et al. [8]	1.13 (1.09-1.17) incremento anual
HbA1c	Xu et al. [7]	1.73 (1.35-2.21) por 1% de incremento
	Kajiwara et al. [8]	1.21 (1.08-1.36) por 1% de incremento
	Jin et al.	1.12 (1.01-1.24) por 1% de incremento
Tensión arterial	Kajiwara et al. [8]	1.02 (1.01-1.03) por mmHg de aumento en la PAS
	Jin et al. [9]	1.80 (1.14-2.86) si la PAS > 140 mmHg y/o PAD > 90 mmHg

Cuadro 2. Resultados de desenlaces ACCORD-lipid en el desarrollo de retinopatía diabética.

Grados de Retinopatía	Ensayo de lípidos			
	Fenofibrato	Placebo	OR (IC 95%)	P
Total original con progresión (≥ 3 pasos, fotocoagulación o vitrectomía)	0.065 (52/806)	0.102 (80/787)	0.60 (0.42-0.86)	0.0056
Total revisado con progresión (≥ 3 pasos, fotocoagulación)	0.061 (49/806)	0.098 (77/787)	0.59 (0.40-0.86)	0.0049
Paso 1 de base, sin RD	0.062 (25/401)	0.059 (22/375)	1.12 (0.61-2.03)	0.72
Pasos 2 a 4 de base: microaneurismas o leve RD en un ojo, sin RD o solo microaneurismas en el ojo contrario	0.030 (8/264)	0.101 (26/258)	0.27 (0.12-0.63)	0.0009
Pasos 5 a 6: RDNP leve a moderada	0.068 (6/88)	0.135 (14/104)	0.41 (0.14-1.18)	0.09
Pasos 7 a 9: RDNP moderada a grave	0.128 (6/47)	0.250 (10/40)	0.44 (0.12-1.62)	0.21
Pasos 10 a 17: RDNP grave o RDP	0.667 (4/6)	0.5 (5/10)		

RD = Retinopatía diabética; RDNP = retinopatía diabética no proliferativa; RDP = retinopatía diabética proliferativa.

Cuadro 3. Tabla de evidencia

Primer autor, año	Ciudad	Etnia	Genotipos y alelos	Tamaño de muestra Con/Sin RD	Valor de <i>p</i>	OR (IC95%)
Da Silva Pereira, 2018 [3]	Brasil	Africanos	-1082AA -1082GG	445/402	0.029 0.232	1.50(1.04-2.17) 1.49 (0.78-2.86)
Paine, 2012 [18]	India	Caucásicos	-1082GG -1082G	253/240	0.0037 0.0048	2.23 (1.27-3.92) 1.44 (1.11-1.87)

Cuadro 4. Análisis por T de Student de las características clínicas de los pacientes de DM2 con RD (casos) y sin RD (controles)

Variables de estudio	Casos (N = 94)			Controles (N = 107)			T-Student	Valor de p
	Media (IC95%)	Mediana	Mín-Máx	Media IC95%	Mediana	Mín-Máx		
Edad (años)	58.27 (55.72-60.81)	61	31-88	54.04 (51.30-56.78)	60	24-78	2.20	0.029
Evolución de la DM2 (años)	13.51 (12.49-14.53)	12	5-30	13.59 (11.01-16.16)	12	1-25	-0.11	0.92
Evolución de la RD (años)	5.61 (5.05-6.16)	5	1-15	0.00	0	0	0.00	0.00
IMC (Kg/m ²)	28.31 (27.48-29.13)	28.4	20.96-37.04	25.39 (24.69-26.09)	23.88	20.66-39.00	5.32	2.73E-07
Peso (Kg)	80.29 (77.11-83.48)	79.5	50-120	67.48 (66.07-68.88)	66	56-95	7.53	1.77E-12
HbA1c (%)	9.18 (8.77-9.60)	9.1	6-16.2	8.02 (7.58-8.46)	7	5.9-16.7	3.75	2.31E-04
Glucosa en Ayuno (mg/dL)	154.30 (153.48-155.12)	150	90-270	135.73 (131.18-140.28)	129	77-250	4.55	1.53E-05
LDL (mg/dL)	85.91 (80.27-91.56)	85	33-140	100.29 (95.04-105.54)	110	28-134	-3.66	3.28E-04
HDL (mg/dL)	43.18 (40.66-45.70)	39	28-74	42.87 (41.33-44.41)	40	28-66	0.21	0.83
Triglicéridos (mg/dL)	186.67 (158.61-214.74)	173	69-674	207.75 (191.13-224.37)	190	89-674	-1.30	0.19

IC95%: Intervalo de Confianza al 95%. IMC: Índice de masa corporal. HbA1C: Hemoglobina glucosilada. LDL: Colesterol de baja densidad. HDL: Colesterol de alta densidad.

Cuadro 5. Análisis por χ^2 de las características clínicas de los pacientes de DM2 con RD (casos) y sin RD (controles)

Variables de Estudio	Casos n (%)	Controles n (%)	χ^2	P	OR (95%IC)
Sexo					
▪ Masculino	66 (70.2%)	61 (57.0%)	3.75	0.053	1.78 (0.99-3.19)
▪ Femenino	28 (29.8%)	46 (43.0%)			
HAS					
▪ Sí	55 (58.5%)	35 (32.7%)	13.47	2.42E-04	2.90 (1.63-5.16)
▪ No	39 (41.5%)	72 (67.3%)			
Tabaquismo					
▪ Sí	44 (46.8)	33 (30.8)	5.39	0.020	1.97 (1.11-3.51)
▪ No	50 (53.2)	74 (69.2)			

n: Número de pacientes. HAS: Hipertensión arterial sistémica. Valor de p con χ^2 de Pearson, nivel de significancia en $p \leq 0.05$.

Cuadro 6. Información de los SNPs estudiados*

Gen	SNP	Cromosoma	Posición en el gen	Alelos reportados	Ubicación
IL10					
-592	rs1800872	1	206773062	C>A	Promotor
-819	rs1800871	1	206773289	C>T	Promotor
-1082	rs1800896	1	206773552	A>G	Promotor

*Información tomada de la base de datos dbSNP encontrada en el NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>.

Cuadro 7. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos del gen de IL10

Polimorfismo	Alelos/ Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	<i>p</i>	OR (95%CI)*
rs1800872 (-592)	C	54.79	57.48	0.588	0.89 (0.60-1.33)
	A	45.21	42.52	0.588	1.11 (0.75-1.66)
Codominante	C/C	26.60	24.30	0.709	1.13 (0.59-2.13)
	C/A	56.38	66.36	0.147	0.66 (0.37-1.16)
Dominante	A/A	17.02	9.35	0.106	1.99 (0.86-4.63)
	C/C	26.60	24.30	0.709	1.13 (0.59-2.13)
Recesivo	C/A+A/A	73.40	75.70	0.709	0.89 (0.47-1.67)
	A/A	17.02	9.35	0.106	0.503 (0.22-1.17)
Sobredominante	C/C+C/A	82.98	90.65	0.106	1.99 (0.86-4.63)
	C/C+A/A	46.62	33.64	0.147	1.53 (0.86-2.70)
rs1800871 (-819)	C/A	56.38	66.36	0.147	0.66 (0.37-1.16)
	C	54.79	57.48	0.588	0.89 (0.60-1.33)
Codominante	T	45.21	42.52	0.588	1.12 (0.75-1.66)
	C/C	26.60	24.30	0.709	1.13 (0.59-2.13)
Dominante	C/T	56.38	66.36	0.147	0.66 (0.37-1.17)
	T/T	17.02	9.35	0.105	1.99 (0.86-4.63)
Recesivo	C/C	26.60	24.30	0.709	1.13 (0.59-2.13)
	T/T+C/T	73.40	75.70	0.709	0.89 (0.47-1.67)
Sobredominante	T/T	17.02	9.35	0.106	1.99 (0.86-4.63)
	C/T+C/C	82.98	90.65	0.106	0.50 (0.22-1.17)
rs1800896 (-1082)	T/T+C/C	43.62	33.64	0.147	1.53 (0.86-2.70)
	C/T	56.38	66.36	0.147	0.66 (0.37-1.16)
Codominante	A	66.49	78.50	0.007	0.54 (0.35-0.85)
	G	33.51	21.50	0.007	1.84 (1.18-2.87)
Dominante	A/A	43.62	57.01	0.059	0.58 (0.33-1.02)
	A/G	45.74	42.09	0.692	1.12 (0.64-1.95)
Recesivo	G/G	10.64	00.00	0.0005	11.82 (0.039-1.68E+6)
	A/A	43.62	57.01	0.059	0.58 (0.33-1.02)
Sobredominante	A/G+G/G	56.38	42.99	0.059	1.71 (0.978-2.99)
	G/G	10.64	0.00	0.0006	254.76 (0.33-1.02)
rs1800896 (-1082)	A/G+A/A	89.36	100.00	0.0006	0.004 (5.96E-7-25.83)
	G/G+A/A	54.26	57.01	0.695	0.89 (0.51-1.56)
	A/G	45.74	42.99	0.695	1.12 (0.64-1.95)

* Odds ratio (95% Intervalo de confianza). Caracteres en negritas y cursivas indican susceptibilidad. Caracteres en negritas y subrayado indican protección. Caracteres sólo en negritas indican tendencia de asociación. Valor de *p* con chi cuadrada de Pearson, nivel de significancia en $p \leq 0.05$.

Cuadro 8. Frecuencia de haplotipos de los polimorfismos del gen de IL10

Haplotipos	Casos (%)	Controles (%)	p	OR (95%CI) *
ATA	43.78	42.29	0.764	0.09 (0.72-1.57)
<u>CCA</u>	<u>22.71</u>	<u>36.21</u>	<u>0.003</u>	<u>0.52 (0.33-0.80)</u>
<i>CCG</i>	<i>32.07</i>	<i>21.26</i>	<i>0.014</i>	<i>1.75 (1.12-2.74)</i>

* Odds ratio (95% Intervalo de confianza). Caracteres en negritas y cursivas indican susceptibilidad. Caracteres en negritas y subrayado indican protección. Valor de p con chi cuadrada de Pearson, nivel de significancia en $p \leq 0.05$. Haplotipo: rs1800872-rs1800871-rs1800896

Cuadro 9. Resultados con significancia estadística obtenidos en la regresión logística multivariada por el método introducir

Variable	Error estándar	Wald	P	OR (95%CI) *
Peso	0.033	24.09	9.18E-07	1.17 (1.10-1.25)
IMC	0.089	5.19	0.023	0.81 (0.69-0.97)
HTAS	0.470	3.99	0.046	2.56 (1.02-6.43)
HbA1C	0.119	6.91	0.009	1.37 (1.08-1.73)
Tabaquismo	0.445	4.62	0.032	2.60 (1.09-6.22)
LDL	0.007	7.19	0.007	0.98 (0.97-0.99)
rs1800896AG	0.443	4.07	0.044	2.44 (1.03-5.83)

La variable dependiente para este análisis fue: con retinopatía diabética y sin retinopatía diabética. Variables independientes utilizadas para el análisis: Edad (años), IMC (kg/m²), Peso (Kg), Hemoglobina Glicosilada (%), Glucosa en ayunas (mg/dL), LDL (mg/dL), Hipertensión (presente, ausente), Tabaquismo (presente, ausente), rs1800896 (A/A, A/G, G/G).

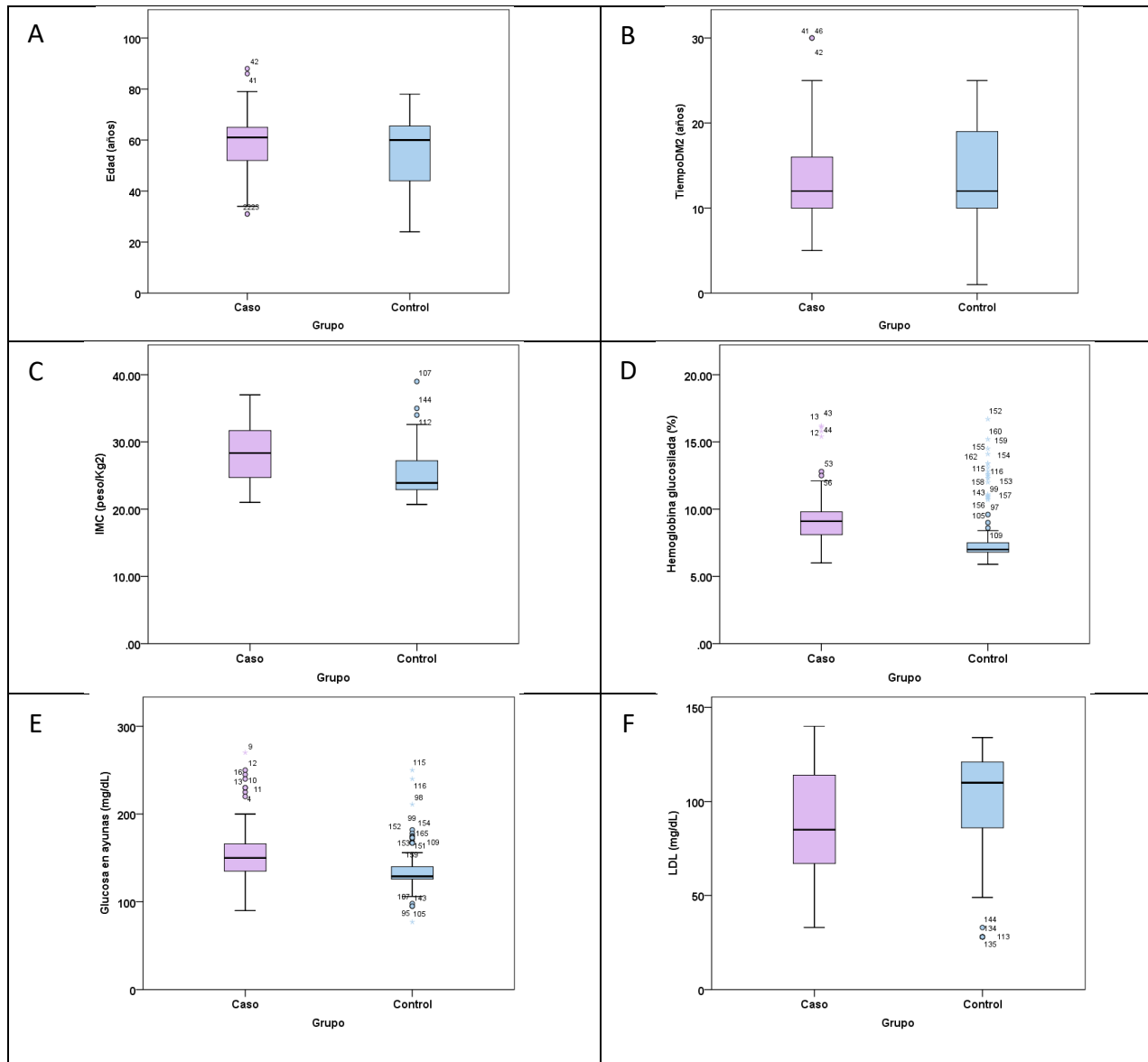
Cuadro 10. Resultados significativos obtenidos en la regresión logística multivariada por pasos hacia atrás de Wald

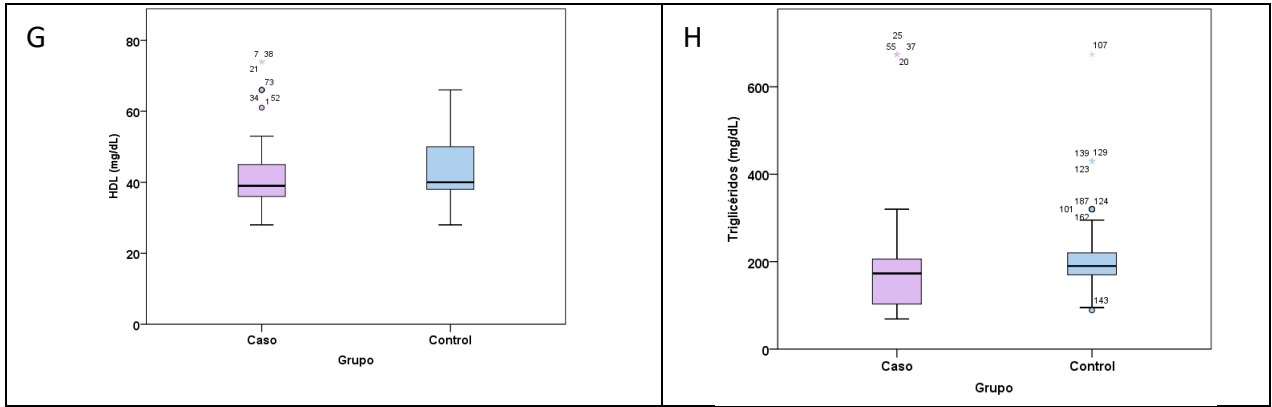
Variable	Error estándar	Wald	P	OR (95%CI) *
Peso	0.033	23.07	1.56E-06	1.17 (1.10-1.25)
IMC	0.089	4.99	0.025	0.82 (0.69-0.98)
HTAS	0.450	5.79	0.016	2.96 (1.22-7.15)
HbA1C	0.117	6.70	0.009	1.35 (1.08-1.70)
LDL	0.007	7.19	0.007	0.98 (0.97-0.99)
rs1800896AG	0.424	5.69	0.017	2.75 (1.20-6.31)

La variable dependiente para este análisis fue: con retinopatía diabética y sin retinopatía diabética. Variables independientes utilizadas para el análisis: Edad (años), IMC (kg/m²), Peso (Kg), Hemoglobina Glicosilada (%), Glucosa en ayunas (mg/dL), LDL (mg/dL), Hipertensión (presente, ausente), Tabaquismo (presente, ausente), rs1800896 (A/A, A/G, G/G).

FIGURAS

Figura 1: Gráfico de cajas y bigotes de las variables: A) Edad, B) Tiempo con la Diabetes tipo 2, C) Índice de Masa Corporal, D) Hemoglobina Glucosilada, E) Glucosa en Ayunas, F) LDL, G) HDL y H) Triglicéridos según grupo de estudio.





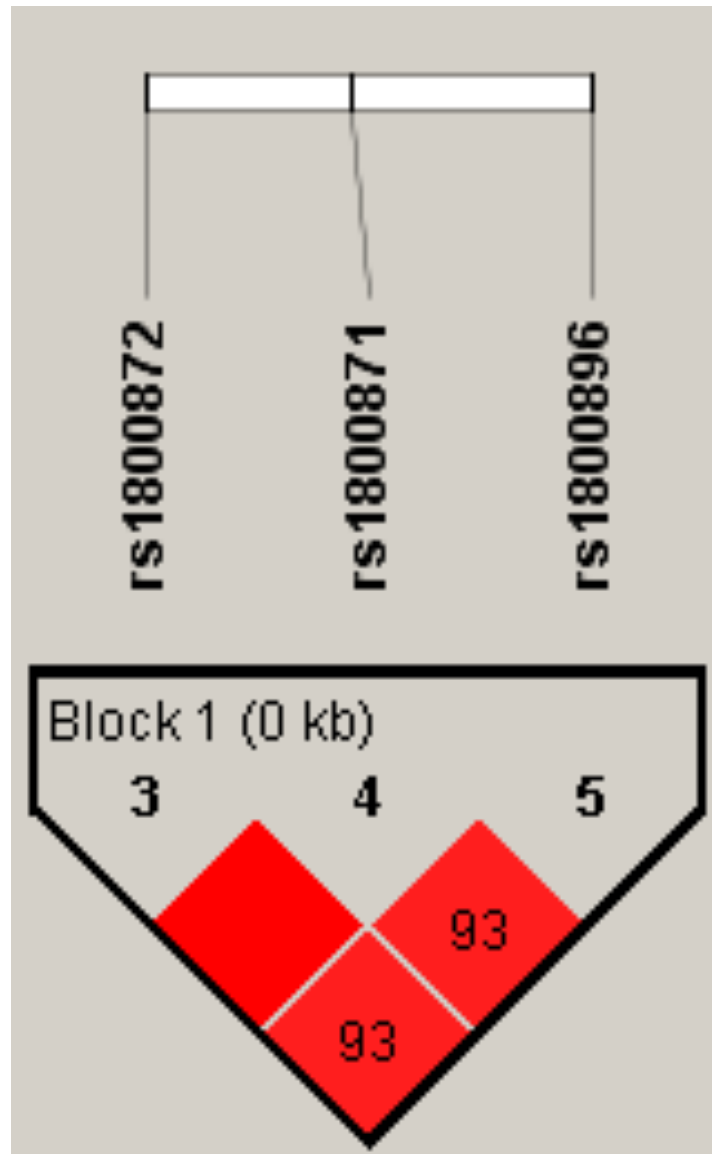


Figura 2. Desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs del gen de *IL10* genotipificados en la diabetes tipo 2. La gráfica de LD fue creada por HAPLOVIEW 4.2.

ABREVIATURAS

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

RD: Retinopatía diabética

IL-10: Interleucina-10

SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

IC 95%: Intervalo de confianza de 95%

IMC: Índice de masa corporal

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

HbA1c: Hemoglobina glucosilada

RR: Riesgo relativo

ADA: Asociación Americana de Diabetes

TNF α : Factor de necrosis tumoral-alfa

IL-6: Interleucina-6

OR: Odds ratio

AAO: Academia Americana de Oftalmología

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SAP: Fosfatasa alcalina de camarón

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

HDL: Lipoproteínas de alta densidad