



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA
FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL
PROMOTOR DEL GEN EPO Y LA RETINOPATÍA DIABÉTICA EN
PACIENTES MEXICANOS

TESIS DE POSGRADO

Para obtener el título de especialidad en

OFTALMOLOGÍA

Presenta

DR. JOSÉ ALEJANDRO CLAROS BUSTAMANTE

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Juan Carlos Zenteno



México, D. F.

2010



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.

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS

PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR. JOSE LUIS RODRIGUEZ LOAIZA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA

DR. JUAN CARLOS ZENTENO

DIRECTOR DE TESIS

***A los pacientes del Instituto, por otorgarme la oportunidad de
asistirlos aprendiendo.***

***A la Dra. Johanna González, por dejar su tendón del carpo en la
pipeta.***

A mis padres por su inagotable paciencia e incondicional apoyo.

A mi madre, bioestadista en formación y asesora metodológica

***A mis amigos y compañeros, por soportar mi inextricable humor
(e inexorable mal humor)***

Al final sabes que todo gira en torno tuyo, Gabriela.

J.A.C.B.

Tabla de Contenido

INTRODUCCIÓN.....	5
<i>RETINOPATIA DIABETICA Y ERITROPOYETINA</i>	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
JUSTIFICACION.....	12
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	14
Extracción de DNA genómico.....	14
TAMAÑO DE MUESTRA	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
RESULTADOS.....	19
Cirugías.....	19
Asociación con comorbilidades	20
Análisis por frecuencia alélica	21
Agudeza visual.....	22
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26

INTRODUCCIÓN

La retinopatía diabética (RD) continúa siendo la principal causa de ceguera irreversible en Estados Unidos y otros países industrializados (1,2). Se define como la disfunción de la vasculatura retiniana causada por la hiperglicemia crónica y corresponde a una complicación microvascular característica de la diabetes mellitus (DM).

La diabetes mellitus es clasificada por la Asociación Americana de Diabetes en su suplemento 1 y actualizada de forma anual. Se divide en 4 categorías clínicas: a) Diabetes tipo 1 (causada por la destrucción de células β que lleva a una deficiencia absoluta de insulina), b) Diabetes tipo 2 (resultado de una deficiencia secretora en un contexto de resistencia a la insulina), c) Otros tipos de diabetes debidos a otras causas (defectos genéticos en la función de las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina, alteraciones del páncreas exocrino y las inducidas por fármacos y d) diabetes gestacional (siempre diagnosticada durante el embarazo). (3)

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un problema de salud pública mundial. Casi 189 millones de personas en todo el mundo tenían diabetes en 2003, cifra que se estima aumentará a 366 millones en el año 2030.

La DM2 también es un problema de salud pública en México, con una prevalencia reportada en adultos mayores de 20 años que va en aumento –de 6.7% en 1993 a 7.5% en 2000- y que podría llegar a 12.3% (11.7 millones) para el 2025. (4) Las complicaciones asociadas a la DM2 fueron la primera causa de muerte en México en 2001. (5) La encuesta nacional de enfermedades crónicas (ENEC) reporta

entre 12-14 millones de personas diabéticas con una prevalencia por grupo etario de 20-29 años de 6.7%, de 30 a 39 años 9.6%, de 40-49 años 13.8% y 17.9% para mayores de 50 años (6).

La prevalencia de RD en la población mexicana con DM2 está reportada entre 42-50%, mucho mayor a la reportada en inmigrantes mexico-americanos. Esta prevalencia se ha reportado en 56.1 y hasta en el 71%. El pico de incidencia es hacia la quinta y sexta década de la vida y hay una marcada predilección por el sexo femenino. (6) Se ha reportado una incidencia de RD a 3 años del 13%, 23% a cuatro años y 47.6% a seis años. Sin embargo, el tiempo de evolución no ha podido relacionarse al grado de retinopatía (7,8)

El control de la glicemia parece ser el común denominador en la prevención de las complicaciones, situación demostrada en múltiples estudios (DCCT, ETDRS, UKPDS, EDIC). Existen predictores sistémicos del desarrollo de RD: Nefropatía diabética evidenciada por proteinuria, elevación del nitrógeno ureico sérico y niveles de creatinina. Incluso pacientes con microalbuminuria tienen mayor riesgo de presentar RD. Recientemente, un estudio proveniente del estudio Acción para Controlar el Riesgo Cardiovascular en Diabetes (ACCORD por sus siglas en inglés) demostró que un control glicémico estricto (HbA1c menor a 6%), es protector para RD y significativamente superior si se compara con el control estándar (HbA1c 7-7.9%) a 4 años de seguimiento. El mismo estudio (ACCORD Eye Study Group) demostró que el fenofibrato para manejo de la dislipidemia resulta también protector, pero un control intensivo de la presión arterial es factor de riesgo para la progresión de la RD (9)

Aunque se trata de una manifestación común y de muy alta prevalencia, no se han dilucidado del todo los mecanismos de patogénesis. Las teorías más aceptadas incluyen la lesión por la vía de la aldosa reductasa. La glucosa y galactosa sufren la conversión a sorbitol y galactitol respectivamente. Estos componentes no se pueden eliminar con facilidad de las células, generando un incremento de la osmolaridad con los correspondientes cambios en el balance de agua. Se ha evidenciado lesión de tipo mediado por aldosa reductasa en el epitelio del cristalino, así como en los pericitos retinianos y células de Schwan, por lo que se propone como un mecanismo común para las manifestaciones microvasculares y neurológicas de la DM.

Los factores vasoproliferativos liberados por la propia retina, los vasos retinianos y el epitelio pigmentario en un ambiente hipóxico tienden a generar neovascularización. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) se ha implicado en la patogénesis de la RD. La concentración de VEGF en el humor acuoso está directamente relacionada con la severidad de la retinopatía (10) Recientemente, se han asociado los niveles altos de eritropoyetina en el humor vítreo como un factor más para el desarrollo de RD (11)

La clasificación clínica de la retinopatía diabética más aceptada en la literatura mundial es la escala de severidad del ETDRS, una modificación de la clasificación de retinopatía diabética de Airlie House(12) Esta clasificación ha sido reconocida como el estándar de oro para la estadificación de la RD. Sin embargo, requiere de una evaluación sistemática que resulta difícil para la práctica clínica diaria. La

efectividad de la escala del ETDRS se ha puesto en duda previamente (13), proponiéndose una clasificación más sencilla.

La clasificación del séptimo reporte del ETDRS es la siguiente:

Nivel 10	Sin retinopatía presente.
Nivel 14	Cualquier combinación de exudados duros, manchas algodonosas, anomalías microvasculares intraretinianas (AMIR) en ausencia de microaneurismas.
Nivel 15	Presencia de hemorragia sin microaneurismas
Nivel 20	Microaneurismas únicamente sin otra lesión diabética.
Nivel 31	Microaneurismas y una o más de las lesiones diabéticas siguientes: Hemorragias, exudados duros, asas venosas, manchas algodonosas dudosas, AMIR o <i>arosareamiento</i> venoso. Foto estándar 2 ^a
Nivel 41	Microaneurismas y uno o más de los siguientes: Manchas algodonosas, AMIR, Foto estándar 8 ^a
Nivel 51	Microaneurismas y uno o más de los siguientes: <i>arosareamiento</i> venoso, hemorragias o microaneurismas $\geq 2^a$ o AMIR $\geq 8a$.
Nivel 60	Proliferación fibrosa sin otra lesión proliferativa
Nivel 61-64	Huellas de fotocoagulación retiniana con niveles de retinopatía 31-35
Nivel 65	Retinopatía diabética proliferativa con menos características de alto riesgo (DRS)
Nivel 70	Retinopatía diabética proliferativa con más características de alto riesgo
Nivel 80	Hemorragia vítrea total

Las fotografías estándar son de uso libre (14)

RETINOPATIA DIABETICA Y ERITROPOYETINA

En un estudio reciente realizado por Tong y cols. (15) se identificó un polimorfismo de base única (SNP) en la región promotora del gen de la eritropoyetina (EPO). Este gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21) y codifica una hormona glicoproteica con una masa molecular de 34 KD. El polimorfismo asociado al desarrollo de retinopatía diabética se conoce como rs1617640 y consiste en un cambio de Guanina (G) a timina (T) en una posición localizada 1125 bases río arriba del inicio de la transcripción del gen EPO. Los sujetos con el genotipo de riesgo T/T (homocigotos T) presentaron concentraciones elevadas de eritropoyetina en promedio 7.5 veces más que sujetos con el genotipo G/G (homocigotos G).

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo al ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) en: sin retinopatía, retinopatía diabética no proliferativa leve, retinopatía diabética no proliferativa moderada, retinopatía diabética no proliferativa severa, retinopatía diabética no proliferativa muy severa, y retinopatía diabética proliferativa. Los sujetos con neovascularización de la papila, neovascularización en otra parte de la retina, hemorragia vítrea, proliferación fibrovascular o con desprendimiento traccional de la retina se consideraron con retinopatía diabética proliferativa.

Se estudiaron inicialmente 19 SNPs en 11 genes candidatos relacionados con angiogénesis y la genotipificación se realizó mediante el ensayo de extensión de

cebador por nucleótido único. La determinación de la concentración de EPO en el humor vítreo fue realizada por ELISA utilizando un anticuerpo policlonal anti-EPO.

El estudio incluyó inicialmente 374 pacientes diabéticos tipo 2 con retinopatía diabética proliferativa y 239 pacientes diabéticos controles con un mínimo de 15 años con diabetes y sin desarrollo de retinopatía o nefropatía. La única asociación identificada fue con el SNP rs1617640 en el que se encontró el alelo T en 63% de los casos comparado con 54% en controles ($P= 0.036$). La segunda fase del estudio comprendió 865 casos que incluían 365 pacientes con diabetes tipo 1 y con retinopatía diabética proliferativa, 500 con retinopatía no proliferativa y 574 diabéticos tipo 1 control sin retinopatía. En este grupo el alelo T se observó en 64% de casos comparado con 53% en controles.

Las concentraciones de proteína EPO fueron 7.5 veces mayores en muestras de vítreo de pacientes de individuos no diabéticos con el genotipo TT comparados con sujetos con el genotipo GG ($P=0.008$).

El alelo de riesgo T es el alelo común con frecuencia alélica comparable entre poblaciones europeas, asiáticas y africanas, lo que indica que el alelo de riesgo puede ser un alelo ancestral.

Una limitación de este estudio es que está confinado a un solo grupo étnico, Europeos-Americanos, por lo que la conclusión no puede ser generalizada a otros grupos poblacionales. Lo anterior hace que se requieran estudios de replicación en otras poblaciones.

Previamente se había identificado un locus de susceptibilidad para nefropatía diabética en 7q21 15-(18)

El alelo T se asocia a niveles elevados de EPO en el humor vítreo de ojos humanos y de modelos de ratón diabético con complicaciones retinianas.

EPO es un potente factor angiogénico expresado en la retina y el riñón y previamente se han demostrado concentraciones elevadas de EPO en humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa (19).

Estos resultados en conjunto implican que la inhibición intraocular localizada de EPO podría tener un efecto terapéutico potencial para el tratamiento o prevención de la retinopatía diabética.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El promotor del gen de EPO tiene un polimorfismo implicado en el desarrollo de la retinopatía diabética en reportes de pacientes en Europa y Estados Unidos. La asociación a éste polimorfismo no se ha determinado en población mexicana con retinopatía diabética.

JUSTIFICACION

Existe evidencia de la participación de la eritropoyetina en el proceso de desarrollo de la retinopatía diabética. En un estudio reciente se identificó que una variante genética en el promotor del gen EPO en 7q21 (Polimorfismo rs1617640) se asocia al desarrollo de retinopatía diabética proliferativa y además condiciona la producción de niveles elevados de eritropoyetina en humor vítreo. Este estudio fue realizado en población Europea-Americana por lo se requieren estudios de asociación de esta variante y retinopatía diabética proliferativa en otros grupos étnicos para confirmar este importante hallazgo. Una asociación positiva podría guiar nuevas líneas de tratamiento para esta afección ocular

HIPÓTESIS

Existe una mayor presentación del alelo TT en pacientes con retinopatía diabética proliferativa en el polimorfismo rs1617640 comparado con el grupo control. Dentro del grupo de pacientes con retinopatía diabética, la presencia de TT está asociada a más complicaciones o comorbilidades.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la asociación del polimorfismo rs1617640, con la ocurrencia de retinopatía diabética y la evolución clínica de los pacientes afectados

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar las frecuencias alélicas del SNP rs1617640 del promotor del gen EPO en un grupo de sujetos mexicanos con retinopatía diabética proliferativa y compararla con la frecuencia observada en controles sin retinopatía diabética.

Identificar la prevalencia de comorbilidades presentes en el grupo de pacientes y asociarlas a las frecuencias alélicas.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de asociación entre casos y controles.

MATERIAL Y MÉTODOS

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se obtuvo la muestra de sangre de los pacientes con retinopatía diabética que se sometían a cirugía en el servicio de Retina del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP por cualquier motivo durante los meses octubre, noviembre y diciembre de 2009. Se consideraron muestras de pacientes control, aquellas obtenidas en este periodo de pacientes sin retinopatía diabética y mayores de 50 años.

Criterios de exclusión: 1) Pacientes que no completen como mínimo 1 mes de seguimiento en el servicio de Retina después del procedimiento al que fueron sometidos. 2) Pacientes que no cuenten con un historial detallado en el expediente electrónico del sistema hospitalario del Instituto.

Extracción de DNA genómico

Se aislará DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica provenientes de una muestra de 2 mL de sangre en cada sujeto participante. La extracción del DNA se realizará con el kit Fuji Film para sangre total y la muestra se procesará en el equipo semiautomatizado de extracción de ácidos nucleicos QuickGene. EL DNA obtenido se resuspenderá en 300 microlitros de Buffer y se almacenará a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

Determinación de la concentración y pureza del DNA: Se determinará la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. La

relación 260/280 permitirá evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se considerarán adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y 2. Además, se realizarán electroforesis en geles de agarosa de cada muestra obtenida para verificar que no exista degradación de del DNA. La concentración de DNA obtenida se determinará por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/ml.

Amplificación por PCR del promotor del gen EPO: Se realizará amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento de la región promotora del gen EPO. Este fragmento incluye el polimorfismo de base única o SNP rs1617640, que se localiza 1125 bases rio arriba del sitio de inicio de transcripción del gen EPO. La amplificación por PCR se realizará con el par de oligonucleótidos EPO rs1617640 FW 5'- TAA GAA CAC TGA AAT ACA GC -3' y EPO rs1617640 RV 5'-TCAAGG ACGAGG CCA CTT TCT A-3', que amplifican un fragmento de 163 pares de bases. Cada reacción de amplificación de PCR tendrá un volumen final de 15 µL que contendrá 100-150 ng de DNA genómico, 7.5 µL de kit Hotstart (Qiagen), 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido) y agua bidestilada. Se utilizará un programa de temperaturas que incluye 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a 56°C y 1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizará 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final. Los productos obtenidos de la amplificación se separarán mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado,

utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pb. Se reconocerán las bandas de interés y se escindirán del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Qiagen).

Secuenciación automatizada de los productos de PCR: Se determinará la concentración del DNA obtenido de la purificación del producto de PCR por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. Se realizarán nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de cada uno de los exones de ABCA4 incluyendo las uniones exón/intrón. Cada reacción de 10 microlitros contendrá 0.5 microlitros de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxionucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y la enzima ampliTaq polimerasa; se agregará además 1 microlitro del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 micromolar, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado, 3.5 microlitros de buffer de secuenciación y agua bidestilada para un volumen final de 10 microlitros. Para esta reacción de PCR se utilizará un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificarán por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de

oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspenderá en 20 microlitros de formamida y posteriormente se desnaturalizará a 95°C por 5 min. Los productos se analizarán por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems) y los genotipos para el SNP rs1617640 serán identificados de manera manual.

TAMAÑO DE MUESTRA

La muestra incluyó a todos los pacientes operados por el servicio de retina en el período antes mencionado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del análisis de variantes alélicas serán expresados en frecuencias simples y porcentajes. Las frecuencias genotípicas entre ambos grupos se compararán utilizando una prueba de χ^2 para identificar significancia estadística. Se considerarán valores significativos de p aquellos <0.05 . De ser necesario, se aplicará prueba exacta de Fisher. La determinación de la razón de momios o razón de probabilidades (odds ratio) para cada variante o haplotipos específicos se realizará por medio de tablas de contingencia de 2 x 2 con la formula:

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Para fines estadísticos, la agudeza visual se convertirá de Snellen a LogMar, tomando el valor de 2.3 para una agudeza de cuenta dedos a 30 cm, de 3.0 para

la percepción de luz que discrimine o no colores y 4 para la no percepción de luz.
Estos valores arbitrarios se obtuvieron de publicaciones indexadas previas (21)

RESULTADOS

Un total de 94 pacientes y 32 controles ingresaron al estudio. El análisis demográfico se presenta en la tabla 1.

El promedio de evolución de DM en el grupo de pacientes fue de 17 años (DE 7.96), con una glicemia preoperatoria promedio de 141.8mg/dL (DE 52.53).

Un total de 57 pacientes ingresaron a quirófano con algún grado de hemorragia vítrea, de los cuales 4(7%) fueron grado I, 4 (7%) grado II, 21 (36.8%) grado III y 28 grado IV (49.2%).

El motivo de cirugía fue primordialmente por patología retiniana. 44 pacientes (46.8%) tuvieron desprendimiento de retina asociado.

Cirugías

En total, en el grupo de pacientes se realizaron 77 facoemulsificaciones, 83 vitrectomías y 5 retinopexias; siendo 67 procedimientos combinados (facoemulsificación + vitrectomía) y 1 caso de facoemulsificación + vitrectomía + retinopexia. 42 pacientes tenían antecedente de fotocoagulación panretiniana previa (retinopatía diabética fotocoagulada).

Tabla 1		
Análisis Demográfico		
Casos	94	100%
Género		
		%
Hombres	38	40.4
Mujeres	56	59.6
Origen		
Centro del País	80	85
Interior de la República	14	15
Edad		
	59.37	± 11.17
Años de evolución de DM	17.59	± 7.96
Controles		
	32	100%
Género		
		%
Hombres	17	53.12
Mujeres	15	46.88
Edad		
	59.8	± 18.63

La tabla 2 muestra la distribución genotípica de rs1617640 tanto del grupo control como de los casos. Al realizar la prueba de χ^2 no se encontró una diferencia significativa entre los patrones de distribución en ambos grupos ($p=0.506$).

Tabla 2. Distribución genotípica de casos y controles				
	Genotipo			Total
	GG	GT	TT	
Casos	9	46	39	94
%	9.6%	48.9%	41.5%	100.0%
Controles	1	17	14	32
%	3.1%	53.1%	43.8%	100.0%
TOTAL	10	63	53	126
%	7.9%	50.0%	42.1%	100.0%

Asociación con comorbilidades

En el análisis de la asociación con comorbilidades por genotipo, no se encontró una correlación significativa con la presencia de complicaciones cardiovasculares e hipertensión arterial ($p=0.761$ y 0.638 respectivamente). Sin embargo, al estudiar la asociación de rs1617640 con insuficiencia renal crónica (IRC), se encontró una relación estadísticamente significativa ($\chi^2 = 6.513$, $p=0.011 < \alpha = 0.05\%$) para el alelo T, como se evidencia en la tabla 3.

Tabla 3 Asociación de IRC por genotipo

		IRC		
		Presente	Ausente	Total
Genotipos	TT	10	36	46
	GT	2	37	39
	GG	0	9	9
	Total	12	84	94

Análisis por frecuencia alélica

El análisis por frecuencia alélica de rs1617640 (tabla 4) presenta un patrón de distribución semejante. Al analizar la asociación entre la frecuencia alélica de T para insuficiencia renal se encuentra una asociación fuerte entre ambas variables ($p=0.035$) como se muestra en la tabla 5.

Tabla 4. Distribución alélica

			GG	GT	TT	Total
Grupo Casos enfermos	Número		9	39	46	94
	%		9.6%	41.5%	48.9%	100.0%
Controles	Número		1	12	16	29
	%		3.4%	41.4%	55.2%	100.0%
Total	Número		10	51	62	123
	%		8.1%	41.5%	50.4%	100.0%

Tabla 5. Asociación alélica con IRC

			IRC		
			Sí	No	Total
T	GG	Número	0	9	9
		%	.0%	100.0%	100.0%
	GT	Número	2	37	39
		%	5.1%	94.9%	100.0%
	TT	Número	10	36	46
		%	21.7%	78.3%	100.0%
Total	Número	12	82	94	
	%	12.8%	87.2%	100.0%	

Agudeza visual

La agudeza visual en LogMAR en el último control en el servicio promedió 1.4 (DE 0.9), un equivalente Snellen de 20/500. Al hacer un análisis por alelo en el control de los 3 y 6 meses de evolución, no se encontró una diferencia significativa entre los grupos (0.514 y 0.990 respectivamente). El grupo para ésta comparación fue muy heterogéneo y el análisis tuvo un poder de 0.153 para los 3 meses y 0.051 para los 6 meses. Este resultado se corroboró con una prueba de Kruskal Wallis (p=0.417).

DISCUSIÓN

El tiempo promedio de evolución en los grupos pacientes con retinopatía diabética coincide con las estadísticas mundiales. Un meta-análisis reciente reveló que el tiempo de evolución para desarrollar RDP ha incrementado desde 1985 a la fecha, con 7.2% a 4 años de 1986-2005. (23)

Probablemente el resultado más relevante de nuestra serie es la fuerte asociación existente entre el alelo T de rs1617640 y la presencia de nefropatía diabética, en pacientes donde la lesión microvascular está demostrada por la retinopatía diabética. Este hallazgo ya fue reportado desde el estudio inicial (15) y recalado en estudios recientes (24,25).

Nuestro estudio encuentra hallazgos que coinciden con los reportados previamente en la literatura. Dentro de nuestra población con DM y retinopatía diabética proliferativa, el alelo T (incluyendo los genotipos TG y TT) tuvo una mayor frecuencia que el alelo G (GG sólo represento el 9% de los casos).

El estudio de Tong y colaboradores (15) evaluó la asociación entre 19 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en 11 genes encontrando como único candidato el polimorfismo rs1617640 ($p=0.00191$) en pacientes con retinopatía diabética proliferativa versus un grupo de controles diabéticos de la cohorte europeo-americana de Utah (T2D). El mismo estudio replica sus resultados en cohortes distintas para dar más fuerza a los mismos. Su análisis por haplotipos reporta que el alelo T es la principal fuente de asociación.

El Instituto tiene las limitaciones propias de un centro de concentración. El seguimiento adecuado y completo de los pacientes que ingresan a un estudio se ve supeditado a la colaboración del paciente y los familiares, situación que no siempre es óptima en el universo que acude a consulta a un centro de carisma asistencial.

Durante la realización del estudio surgieron nuevas inquietudes en las que vale la pena profundizar en futuras publicaciones. Se ha demostrado un incremento de hasta 7.5 veces en la concentración de eritropoyetina en vítreo en pacientes con el polimorfismo rs1617640. La población que se somete a cirugía vitreoretiniana en nuestro instituto suelen tener hemorragia vítrea previa, dificultando una determinación fidedigna de eritropoyetina (la eritropoyetina podría provenir del sangrado). Sin embargo, puede buscarse una asociación con la eritropoyetina en sangre.

Un análisis que pudiera afirmar que el alelo G del polimorfismo rs1617640 confiere un factor protector requiere una muestra mucho mayor, pero sobre todo un grupo de controles que tengan un tiempo de evolución de DM semejante al de casos y que no hayan desarrollado retinopatía diabética. Los criterios internacionales requieren de cuando menos 10 años de evolución de DM para que se pueda considerar que un paciente no ha desarrollado RD.

La presencia de eritropoyetina en el vítreo tiene un efecto fisiopatológico en el desarrollo de la retinopatía diabética. García-Hernández y colaboradores documentaron la sobreexpresión de eritropoyetina en retinas de pacientes con

diabetes sin datos clínicos de retinopatía diabética (tanto mRNA como la proteína).

(22) El estudio concluye que la sobreexpresión de eritropoyetina antecede al estímulo hipóxico y no está presente en los ojos de donadores sin diabetes. La posibilidad de detectar una predisposición a desarrollar insuficiencia renal y retinopatía diabética –y su eventual intervención terapéutica – son las principales líneas de investigación que deben surgir de estos hallazgos.

Un factor confusor en nuestro estudio es el control glicémico. La hiperglicemia es el factor fisiopatológico y pronóstico más relevante de la diabetes mellitus. Un mejor marcador de control es la hemoglobina glucosilada (HbA1c), la cual evidencia el promedio de glicemia de los últimos 3 meses. Se propone un cambio hacia este marcador tanto para asegurarse de un control adecuado en beneficio del paciente, como para fines de investigación y seguimiento.

CONCLUSIONES

La retinopatía diabética continúa siendo una creciente causa de limitación en la función visual en nuestro país.

La principal aportación de este trabajo es el descubrimiento de la fuerte asociación entre la retinopatía diabética proliferativa y la nefropatía diabética en pacientes con haplotipo T en rs1617640. Esto marca un precedente para iniciar una línea de investigación en el instituto para corroborar este hallazgo como factor de riesgo, probablemente en un estudio de cohortes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kempen J, O'Colmain B, Leske M, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122:552-63.
2. Rosenblatt B, Benson W. 2009. Diabetic Retinopathy. En Wiggs J, Miller D, Azar D, Goldstein M, Rosen E, Duker J, et al. editors. *Yanoff&Duker Ophthalmology*, 3ra ed. New York: Elsevier. P613-621.
3. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes Care* 2010;33: S11-61.
4. Rodriguez-Villalobos E, Cervantes-Aguayo F, Vargas-Salado E, Avalor-Muñoz M, Juarez-Becerril D, Ramirez-Barba E: Retinopatía diabética. Incidencia y progresión a 12 años. *CirCiruj* 2005;73:79-84.
5. Terrés-Speziale A: Evaluación de tres estudios internacionales multicentricos prospectivos en el estudio y manejo de la diabetes mellitus. *RevMex Patol Clin*, 2006;53:104-13.
6. Prado-Serrano A, Guido-Jiménez M, Camas-Benítez J: Prevalencia de retinopatía diabética en población mexicana. *RevMex Oftalmol*;83:261-66.
7. Rodriguez-Villalobos E, Ramírez-Barba E, Cervantes-Aguayo F, Vargas-Salado E: Diabeticretinopathy and risk of blindness in Mexico. Are we doing enough? *Diabetes Care* 1999;22:1905.
8. Lima V, Rebollar M: Comparación de la duración de la diabetes en pacientes con diferentes grados de retinopatía. *MedIntMex* 2005;21:403-8.

9. The Accord Study Group and ACCORD Eye Study Group: Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2010 *on press*.
10. Noma H, Funatsu H, Yamashita H, et al. Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: Possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *ArchOphthalmol*. 2002;120: 1075-80.
11. Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, Suzuma I, Ohashi H, Ojima T, Murakami T, Kobayashi T, Masuda S, Nagao M, Yoshimura N, Takagi H. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2005;353:782-92.
12. Diabetic Retinopathy Study Research Group. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. Report 7. *InvestOphthalmol Vis Sci* 1981;21:210–26.
13. Wilkinson C, Ferris F, Klein R, Lee P, Agardh C, Davis M, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003;110:1677–82
14. <<http://eyephoto.opth.wisc.edu/ResearchAreas/Diabetes/DiabStds.htm>>
FECHA DE ACCESO 20/nov/2009.
15. Tong Z, Yang Z, Patel S, Chen H, Gibbs D, Yang X, Hau VS, Kaminoh Y, Harmon J, Pearson E, Buehler J, Chen Y, Yu B, Tinkham NH, Zabriskie NA, Zeng J, Luo L, Sun JK, Prakash M, Hamam RN, Tonna S, Constantine R, Ronquillo CC, Sadda S, Avery RL, Brand JM, London N, Anduze AL, King GL, Bernstein PS, Watkins S; Genetics of Diabetes and Diabetic

- Complication Study Group, Jorde LB, Li DY, Aiello LP, Pollak MR, Zhang K. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:6998-7003.
16. Iyengar SK, Abboud HE, Goddard KA, Saad MF, Adler SG, Arar NH, Bowden DW, Duggirala R, Elston RC, Hanson RL, Ipp E, Kao WH, Kimmel PL, Klag MJ, Knowler WC, Meoni LA, Nelson RG, Nicholas SB, Pahl MV, Parekh RS, Quade SR, Rich SS, Rotter JI, Scavini M, Schelling JR, Sedor JR, Sehgal AR, Shah VO, Smith MW, Taylor KD, Winkler CA, Zager PG, Freedman BI; Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group. Genome-wide scans for diabetic nephropathy and albuminuria in multiethnic populations the family investigation of nephropathy and diabetes (FIND). *Diabetes*. 2007;56:1577-85.
17. Imperatore G, Knowler WC, Nelson RG, Hanson RL. Genetics of diabetic nephropathy in the Pima Indians. *Curr Diab Rep*. 2001;1(3):275-81.
18. Kanková K, Stejskalová A, Pácal L, Tschoplová S, Hertlová M, Krusová D, Izakovicová-Hollá L, Beránek M, Vasků A, Barral S, Ott J. Genetic risk factors for diabetic nephropathy on chromosomes 6p and 7q identified by the set-association approach. *Diabetologia*. 2007 May;50:990-9.
19. Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, Suzuma I, Ohashi H, Ojima T, Murakami T, Kobayashi T, Masuda S, Nagao M, Yoshimura N, Takagi H. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2005;353:782-92.
20. Gregori N, Feuer W, Rosenfeld P: Novel method for analyzing Snellen visual acuity measurements. *Retina* 2010;30:1046-50.

21. Heimann H, Bartz-Schmidt K, Bornfeld N, Weiss C, Hilgers R, Foerster M: Scleral buckling versus primary vitrectomy in rhegmatogenous retinal detachment. *Ophthalmology* 2007;114:2142-54.
22. Garcia-Ramirez M, Hernández C, Simó R: Expression of erythropoietin and its receptor in the human retina. A comparative study of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008; 31:1189-94.
23. Wong T, Mwamburi M, Klein R, Larsen M, Flynn H, Hernandez-Medina M, et al: Rates of progression in diabetic retinopathy during different time periods. *Diabetes Care* 2009; 32:2307-13.
24. Navarri J, Mora-Fernández C, Macía M, Martínez A, Górriz J, del Alvaro F: Fisiopatología de la nefropatía diabética. *NefroPlus* 2008; 1:28-38.
25. Abhary S, Burdon K, Casson R, Goggin M, Petrovsky F, Craig J: Association between erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2010;128:102-106.