



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO

FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ, I.A.P.

**“Asociación de los polimorfismos
del factor de crecimiento vascular
endotelial en distintos
grados de retinopatía diabética”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
CIRUJANO OFTALMÓLOGO

PRESENTA:

DR. ANDRÉS TRASLOSHEROS ENKERLIN

ASESORES DE TESIS

DRA. ADRIANA SAUCEDO CASTILLO

DR. HÉCTOR JAVIER PÉREZ CANO



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.

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2019

DR. ALEJANDRO BABAYÁN SOSA
PROFESOR TITULAR ANTE LA UNAM

DR. OSCAR BACA LOZADA
PROFESOR ADJUNTO

DRA. ADRIANA SAUCEDO CASTILLO
PROFESOR ADJUNTO / JEFE DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACIÓN

ASESOR DE TESIS

DR. JAIME LOZANO ALCAZAR
DIRECTOR MÉDICO

DRA. STEPHANIE VOORDUIN RAMOS
SUBJEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR. HÉCTOR PÉREZ CANO
ASESOR DE TESIS / INVESTIGADOR TITULAR
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Agradecimientos

A mi familia y amigos, verdaderos maestros de la vida, por su incondicional apoyo a pesar de los pesares.

Índice

| | |
|---|----|
| Marco teórico:..... | 1 |
| Panorama general | 1 |
| Variaciones genéticas..... | 1 |
| VEGF, estructura y función..... | 2 |
| Polimorfismos de VEGF y su correlación clínica..... | 3 |
| Metanálisis | 5 |
| Justificación | 6 |
| Planteamiento el problema..... | 6 |
| Pregunta de Investigación..... | 6 |
| Hipótesis:..... | 7 |
| Objetivos | 7 |
| General..... | 7 |
| Específicos | 7 |
| Material y Métodos..... | 7 |
| Análisis estadístico | 10 |
| Variables estudiadas | 10 |
| Criterios | 11 |
| Inclusión | 11 |
| Exclusión..... | 12 |
| Eliminación | 12 |
| Tamaño de la muestra | 12 |
| Recursos financieros y de factibilidad..... | 12 |
| Bioseguridad..... | 13 |
| Cronograma..... | 13 |
| Resultados | 14 |
| Discusión | 19 |
| Conclusiones | 22 |
| Bibliografía | 23 |

Asociación de los polimorfismos del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en distintos grados de retinopatía diabética

Marco teórico:

Panorama general

En el año 2011 los pacientes con diabetes mellitus ascendían a 366 millones, para el 2030 esta cifra se calcular en 552 millones de personas. Las complicaciones por la retinopatía diabética se estiman que son causa de ceguera legal en el 2.6% de la población a nivel mundial.¹ Entre pacientes diabéticos la retinopatía diabética proliferativa constituye la principal causa de ceguera en pacientes en edad laboral. A pesar de esto 20% de los pacientes no desarrollan retinopatía diabética², mientras que el 28% desarrollan retinopatía en etapas tempranas de la enfermedad³, lo cual hace importante identificar los factores que determinan este hecho.

Los fármacos antiangiogénicos muestran una tasa de respuesta variable entre las distintas complicaciones derivadas por la diabetes y entre diferentes estudios.

Variaciones genéticas

En el estudio FIND-Eye realizado en el 2008⁴ se observó una predisposición genética a desarrollar más fenotipos con mayores complicaciones microvasculares entre

algunos pacientes diabéticos, sin embargo sólo la mitad de los pacientes con retinopatía diabética no proliferativa progresan a estadios más avanzados.⁵ Por otra parte el Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR) mostró que el 28.8% de los pacientes diabéticos desarrollaban retinopatía en etapas tempranas, mientras que el 22.2% con diagnóstico de diabetes, sin importar los niveles de glucemia, no desarrollaban retinopatía³.

Los latinos presentan mayor riesgo a desarrollar más hemorragias intrarretinianas y en general un peor pronóstico.⁶ Se han identificado diversos polimorfismos que contribuyen a una mayor riesgo para desarrollar retinopatía diabética, entre ellos se encuentran polimorfismos para la aldosa reductasa, la Proteína cinasa C, la glucosilación, HLA y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

VEGF, estructura y función

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es una glicoproteína homodimérica de 45-kDa se encuentra en el cromosoma 6p21.3 y es altamente polimórfica.² Cuenta con 8 exones y 7 intrones.⁷ Existen 6 miembros en la familia VEGF: VEGF-A (al cual normalmente nos referimos simplemente como VEGF), factor de crecimiento placentario, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E.⁸ Mutaciones en las regiones no traducidas 5' y 3' podrían alterar la estabilidad del RNAm en diversas condiciones intracelulares como la hipoxia.

En el ojo, VEGF se sintetiza por vasos retinianos, células endoteliales, pericitos, células de Müller, epitelio pigmentario y células ganglionares. El aumento en su producción puede deberse a un estado de hiperglicemia y en consecuencia la síntesis de producción de

productos de glucosilación avanzada (AGEs),⁹ estos incrementan el VEGF a través de la activación de la proteína cinasa C en los vasos coroideos y por estrés oxidativo a través de la vía STAT3 (*signal transducer and activator of transcription factor 3*).⁸ En estados de hipoxia hay unión de factores inducibles por hipoxia en regiones de respuesta a hipoxia lo cual también eleva la síntesis de VEGF.²

VEGF cuenta con dos receptores: VEGFR1 y VEGFR2¹⁰ los cuales se han identificado en células endoteliales vasculares y difieren en su actividad biológica. La mayor afinidad la presenta VEGFR1, sin embargo tiene un rol menor en la función *in vitro*, mostrando una actividad moduladora negativa en la formación vascular y todavía no se conoce su papel en la retinopatía diabética. La ausencia de VEGFR2 previene la respuesta celular a VEGF y se encuentra involucrado en la diferenciación de las células endoteliales y en la retinopatía diabética, encontrándose sobreexpresado y con una asociación significativa con su inicio y/o progresión.⁸

La sobreexpresión de VEGF está relacionada con una pérdida de la barrera hemato-retiniana y aumento en la permeabilidad vascular, neovascularización,⁸ y en el humor vítreo correlacionan con la severidad del edema macular y la retinopatía diabética.^{1,2,9}

Polimorfismos de VEGF y su correlación clínica

Entre los polimorfismos estudiados destacan C-634G rs2010963, el cual incrementa la actividad basal de promotor.² Esta mutación ha encontrado asociada a edema macular en Japón y Egipto.¹ Nakamura y cols,¹¹ estudiaron la asociación de este polimorfismo en población japonesa, sin encontrar una correlación con retinopatía diabética, sin embargo reportan una asociación con -2578 C/A. En el estudio también se midió la concentración de

VEGF en muestras de vítreo y plasma de los pacientes con retinopatía proliferativa, sin encontrar correlación con el polimorfismo -634, lo cual contradice resultados reportados por otros estudios.¹²

En población coreana Chun y cols¹³ analizaron los polimorfismos rs699947, rs1570360 y rs2010963, realizando también mediciones de VEGF en el humor vítreo de un subgrupo de pacientes. Los resultados indican una asociación positiva entre el alelo A de rs699947 y retinopatía diabética, el genotipo CC se consideró factor protector al encontrarlo en menor frecuencia en los pacientes afectados. Los demás polimorfismos no mostraron diferencias significativas. Los niveles de VEGF en humor vítreo también se encontraron elevados en el genotipo CA comparando con el genotipo CC.

En un estudio realizado por Szaflik y cols en población polaca también encontró una asociación entre el polimorfismo -634 G/C y el desarrollo de retinopatía diabética.² Pacientes con el genotipo CC mostraron niveles séricos más altos de VEGF al compararlos con los genotipos C/G y G/G, en este mismo genotipo se encontraron mejores respuestas a antagonistas de VEGF. El fenotipo G/G por otra parte mostró ser un predictor independiente de neovascularización y retinopatía diabética proliferativa en un estudio realizado por Feghhi y cols.¹⁴

Uthra y cols⁹, también estudiaron el polimorfismo -634 C/G en población originaria de la India, el cual a pesar de conceder un riesgo incrementado, éste no fue estadísticamente significativo, sin embargo, al realizar un análisis estratificado por la presencia de microalbuminuria si fue significativo. Nuevamente los autores reportan resultados contradictorios con la literatura de acuerdo a la población estudiada.¹²

Otros polimorfismos de interés son la inserción/delección (I/D) del fragmento 18bp en la posición -2549 en la región del promotor y G/C en +405 en la región no traducida 5'. En un

en estudio realizado por Buraczynska y cols en población polaca se encontró una asociación en el genotipo I/D con retinopatía diabética al controlar para variables clínicas, sin embargo el genotipo +405 no fue estadísticamente significativo, lo cual contradice resultados reportados en población japonesa.¹⁵ Estudios en el genotipo CA del polimorfismo -2578, localizado en la región promotora muestran una asociación con la retinopatía diabética, excepto en población caucásica.

Metanálisis

En un estudio realizado por Xiu-Jing y cols⁷ se analizaron artículos que analizaron la relación de los polimorfismos rs2010963 (G>C), rs833061 (T>C), rs699947 (C>A), rs3025039 (C>T) y rs1570360 (G>A). Los autores incluyeron estudios de casos y controles donde los controles fueran diabéticos sin retinopatía, realizando también análisis por subgrupos para comparar pacientes con retinopatía diabética no proliferativa contra pacientes con retinopatía diabética proliferativa. Los estudios que incluyeron fueron 16, de los cuales 5 fueron en población caucásica, 3 en China, 3 en Japón, 2 en Korea, 2 en India y uno en Egipto. En este estudio se confirmó la asociación de rs3025039 (G>T) y rs833061 (T>C) con un mayor riesgo de retinopatía diabética.

Por otra parte Han y cols³ también realizaron un metanálisis en el cual incluyeron 11 estudios de casos y controles. Los autores se enfocaron en los polimorfismos más estudiados: -2578 C/A rs699947, -1154 G/A rs570360, ubicados en la región del promotor; -634 G>C rs2010963, -460 T/C rs833061 en la región no traducida (UTR) 5' y +936 C/T rs3025039 en 3'-UTR. Estos estudios fueron realizados en población caucásica y asiática. Los autores reportan una asociación para +936 C/T (en poblaciones asiáticas) y -460 T/C. En los demás polimorfismos no se pudo determinar una asociación.

A pesar del creciente volumen de información y la investigación realizada todavía no se cuentan con suficientes estudios para identificar con precisión el riesgo de complicaciones entre distintos grupos étnicos, entre ellos los latinos, en los cuales, hasta el momento de esta revisión, no se cuenta con publicaciones en los cuales se les considere.

Justificación

La diabetes mellitus es un creciente problema de salud pública que obliga a buscar formas de identificar a pacientes en riesgo potencial de presentar complicaciones como la retinopatía diabética. El estudio de los polimorfismos de VEGF podría representar una herramienta para el tamizaje de pacientes e identificar aquellos en los que sea necesario un seguimiento más estrecho. Actualmente no contamos con estudios realizados en población latina que nos indiquen la prevalencia de estos polimorfismos ni su asociación con la presencia de retinopatía diabética.

Planteamiento el problema

VEGF tiene un papel fundamental en la fisiopatología de la retinopatía diabética. Estudiar sus polimorfismos y buscar diferencias entre los pacientes con retinopatía diabética proliferativa y no proliferativa podría constituir una herramienta útil en el tamizaje de pacientes y la planeación de su tratamiento.

Pregunta de Investigación

¿Existe alguna asociación entre los distintos grados de retinopatía diabética y la presencia de polimorfismos en el gen que codifica para VEGF?

Hipótesis:

H1: Existe una asociación entre la presencia de los distintos grados de retinopatía y la presencia de polimorfismos en VEGF.

H2: No existe una asociación entre la presencia de los distintos grados de retinopatía y la presencia de polimorfismos en VEGF.

Objetivos

General

Estudiar la correlación entre polimorfismos de VEGF y la presencia de retinopatía diabética

Específicos

- Estudiar la correlación entre el polimorfismo rs2010963, rs699947 con la presencia de retinopatía diabética proliferativa y no proliferativa en pacientes con más de 10 años de diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2.

Material y Métodos

Material y Métodos

Estudio de casos y controles, prospectivo y analítico. Se reclutará un grupo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa y un grupo con retinopatía diabética no proliferativa.. Previo consentimiento informado se obtuvo una muestra de sangre, por punción venosa, utilizando EDTA como anticoagulante.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit QIAamp mini kit® (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor.

A 200 µL de la muestra se le adicionó 250µL de la solución de lisis CLS, las muestras fueron incubadas a 56°C/60min, en presencia de 30 µL proteinasa K (1mg/mL) y se agitó en vórtex cada 10min. Posteriormente se adicionó 100 µL de la solución de precipitación para incubar en refrigeración/5 min, las muestras fueron centrifugadas nuevamente y se decantaron en un nuevo tubo Eppendorf para hacer los lavados con 300 µL isopropanol, se homogenizo invirtiéndolos de manera suave aproximadamente 50 veces, con una tercera centrifugación por 5 minutos se decantó el sobrenadante y se precipitó con 300 µL de etanol al 70%. Las muestras se dejaron concentrar a 35°C/12hrs donde finalmente se agregó 100 µL de solución de hidratación; el material genético fue almacenado a -20°C hasta su estudio.

*Cabe destacar que todo el material que se empleó para esta técnica era material nuevo, estéril y libre de DNasas - RNasas

PCR paraTLR2

Se realizó la técnica de PCR para amplificar los sitios de interés del gen VEGFA (-634G>C y -2578G>C). Cada reacción fue hecha en un volumen total de 20µL conteniendo 10 µLde

la HotStarTaq Master Mix Polimerase (QIAGEN Sciences. Maryland, USA), (con 2.5 U de Taq polimerasa, 1.5 nM de Mg₂Cl, 200uM de cada dNTP, 1X del buffer de reacción) y 0.3µL de los oligonucleótidos específicos para cada región.

La amplificación fue realizada utilizando el programa 95°C/10 min, y 40 ciclos a 95°C/1 min, con la T_m específica para cada par de oligonucleótidos/1 min y una extensión a 72°C/10min. La reacción se realizó en un termociclador AXYGEN MAXYGENE PCR System 2400 (Perkin Elmer Co. Norwalk, Connecticut)

Electroforesis

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 90V durante 40 minutos y se usó como marcador de pesos moleculares el Track It™100 bp DNA Ladder (Invitrogen, L.T.), a las muestras se les añadió 2 µL de Gel RedNucleicAcidStain™ de Biotium y fueron observados bajo luz ultravioleta utilizando el transiluminador de UVP BioLite™ MultiSpectralSource con el programa Launch Vision Works LS.

Las bandas con el amplificado fueron cortadas para su posterior purificación utilizando los reactivos de QIAquick gel extraction kit.

Se colocó la banda a purificar en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le adiciono 400µL del buffer QG, las muestras fueron incubadas a 56°C en baño María por 15min, mezclando en vórtex cada 3 min, se le adiciono 200 µL de Isopropanol y se pasó a una Columna QIA con tubo colector, que posteriormente se centrifugaron a 13000 RPM/1min y se descargó el sobrenadante para adicionar 500 µL del buffer QG, se concentraron las muestras a 13000 RPM/1min, se descartó el centrifugado y se lavó las muestras con 750 µL de Buffer de PE , se centrifugo A 13000 rpm/1min dos veces descartando el sobrenadante para eliminar el buffer PE, Se pasó la columna QIA a un tubo Eppendorf nuevo para la adición de 30µL de H₂O, después de un incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 13000

RPM/1min y el producto de amplificación obtenido se utilizó para la secuenciación nucleotídica

Secuenciación

Se realizó secuenciación automatizada directa por el método de terminadores fluorescentes (Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) utilizando el programa de temperaturas que incluyen 25 ciclos de desnaturalización a 97°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 50°C por 15 segundos y una temperatura de extensión de 60°C por 4 minutos. El producto obtenido se analizó en un secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias de DNA obtenidas se compararon con la secuencia del gen reportada en la base de datos www.ensembl.org/index.html

Análisis estadístico

Para variables continuas paramétricas y análisis univariado se empleará prueba de t de Student o ANOVA dependiendo del número de variables a comparar. Para variables continuas no paramétricas se empleará prueba de U de Mann-Whitney o Kruskal Wallis de acuerdo al número de variables y para variables categóricas o nominales una prueba de Chi cuadrada.

Variables estudiadas

| Nombre | Tipo |
|--------------------------|-------------|
| Diabetes Mellitus tipo 2 | Dicotómica |

| | |
|---|------------|
| Duración de la Diabetes Mellitus | Continua |
| Tratamiento oral para DM tipo 2 | Dicotómica |
| Tratamiento con insulina para DM tipo 2 | Dicotómica |
| Hipertensión | Dicotómica |
| Dislipidemia | Dicotómica |
| No retinopatía diabética | Dicotómica |
| Retinopatía diabética no proliferativa | Dicotómica |
| Retinopatía diabética proliferativa | Dicotómica |
| Edad | Continua |
| Sexo | Continua |
| Tensión arterial | Continua |
| Peso | Continua |
| Talla | Continua |
| Índice de masa corporal | Continua |
| HbA1c | Continua |
| Polimorfismos | |
| -634G>C (rs2010963) | Dicotómica |
| -2578G>C (rs699947) | Dicotómica |

Criterios

Inclusión

- Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de más de 10 años de evolución con retinopatía diabética no proliferativa o proliferativa de acuerdo a las definiciones establecidas por el ETDRS.

Exclusión

- Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de menos de 10 años de evolución.

Eliminación

- Retiro del consentimiento informado por parte del paciente.

Tamaño de la muestra

Empleando Epi Info 7, para un estudio de casos y controles no pareado, con un poder del 80%, error alfa de 5%, intervalo de confianza 95%, y considerando una exposición de los casos mayor a 10%, se requiere una muestra de 150 pacientes (75 casos y 75 controles).

Recursos financieros y de factibilidad

El financiamiento de la investigación estará a cargo de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz. El Centro de Investigación Biomédica cuenta con la infraestructura adecuada para llevar a cabo el protocolo de investigación

Bioseguridad

Existe riesgo biológico-infeccioso por el manejo de muestras biológicas, de tal forma que se trabajará cumpliendo la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección Ambiental - Salud Ambiental - Residuos Peligrosos Biológico-infecciosos - Clasificación Y Especificaciones De Manejo, para evitar la contaminación al medio ambiente y disminuir el riesgo para la salud humana.

Cronograma

| | Abril 2017 | Mayo 2017- Febrero 2018 | Marzo 2018- Diciembre 2018 | Diciembre 2018 – Enero 2019 | Diciembre 2018 – Febrero 2019 |
|---|------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Elaboración de protocolo | | | | | |
| Reclutamiento de pacientes y toma de muestras | | | | | |
| Procesamiento de muestras | | | | | |
| Análisis Estadístico | | | | | |
| Elaboración de reporte final | | | | | |

Resultados

Variables demográficas

| VARIABLES DEMOGRÁFICAS | Clasificación de retinopatía diabética | | | p |
|----------------------------------|--|-----------------|-----------------|--------|
| | NRD (n=21) | RDNP (n=15) | RDP (n=29) | |
| Edad (±DE) | 66 (±9.5) | 67.4 (±6.86) | 57.68 (±8.00) | 0.001* |
| Sexo femenino (%) | 66.67 | 46.67 | 58.62 | 0.48 |
| COMORBILIDADES: | | | | |
| Hipertensión arterial (%) | 52 | 80 | 51 | 0.15 |
| Otras sistémicas (%) | 14 | 20 | 3.5 | 0.2 |
| Oftalmológicas (%) | 19 | 26.7 | 7 | 0.19 |
| Años de diagnóstico (±DE) | 15.95 (±6.47) | 17.13 (±5.54) | 17 (±6.64) | 0.8 |
| Última glicemia (±DE) | 145.90 (±63.37) | 147.14 (±47.36) | 170.96 (±66.17) | 0.4 |

Tabla 1: Variables demográficas. NDR (No retinopatía diabética), RDNP (Retinopatía diabética no proliferativa), RDP (Retinopatía diabética proliferativa). *p < 0.05 fue considerada como estadísticamente significativo.

Se obtuvieron muestras de 69 pacientes los cuales se catalogaron en tres grupos de acuerdo a la clasificación del ETDRS: no retinopatía diabética (NRD), retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) y retinopatía diabética proliferativa (RDP). Para variables continuas se empleó una prueba de t-de Student y para variables categóricas y nominales se empleó una Chi cuadrada, se determinó un valor de $p < 0.05$ como significativo.

La edad promedio en el grupo con NRD fue de 66 años con una desviación estándar (DE) de ± 9.5 años, en el grupo RDNP fue de 67.4 años con una DE igual a ± 6.86 años y el grupo de RDP presentó una media de 57.68 años con ± 8.00 , con diferencia estadísticamente

significativa entre los grupos NDR y RDNP con RDP ($p=0.001$). El sexo predominante fue el femenino en el grupo con NRD (66.67%) y en el grupo de RDP (58.62%) solo el grupo de RDNP predominó el sexo masculino. En los años de diagnóstico el grupo con NRD presentó un promedio de 15.95 años con ± 6.47 años de DE, el grupo con RDNP 17.13 años ± 5.54 y el grupo con RDP 17 años ± 6.64 . Los niveles de glicemia se encontraron similares en el grupo con NRD con una media de 145.90 ± 63.37 años y el grupo RDNP con 147.14 ± 47.36 años, el grupo con RDP presentó niveles más altos de última glicemia con 170.96 de promedio ± 66.17 años, aunque no se consideró significativo. Se registraron también las comorbilidades, dividiéndolas en tres grupos: hipertensión arterial sistémica la cual se presentó en el 52% de los pacientes con NRD, 80% con RDNP y 51% de pacientes con RDP; otras comorbilidades sistémicas (dislipidemia, hipotiroidismo, EPOC, insuficiencia renal crónica) encontrando una frecuencia del 14% en NRD, 20% en RDNP y 3.5% en RDP; las comorbilidades oftalmológicas incluyeron DMRE, glaucoma, síndrome ocular isquémico y membrana epirretiniana, encontrándolas en el 19% de los pacientes con NRD, 26.7% en el grupo de RDNP y 7% en el grupo de RDP. Ninguna variable mostró diferencias significativas entre los grupos (Tabla 1).

Polimorfismo -634

Análisis genético y alélico

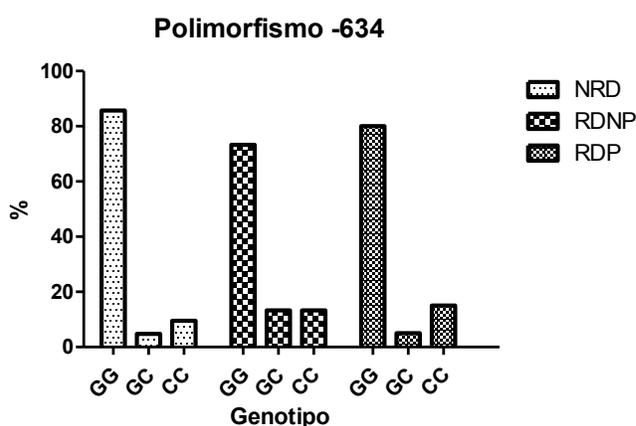
Se estudió el polimorfismo G>C en la región -634 del gen VEGF sin encontrar una diferencia significativa en los grupos ($p=0.82$) (Tabla 2). En la muestra el genotipo más común fue el GG encontrado en el grupo sin retinopatía diabética (NRD) en el 85.71% de los casos, contra una distribución del 73.33% en el grupo con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) y 80% en los pacientes con retinopatía diabética proliferativa. Los otros dos

genotipos se encontraron en una distribución de 4.76% en el grupo NRD, 13.33% en el grupo RDNP y 5% en los casos con RDP para el polimorfismo GC y en el caso del polimorfismo CC se encontró en el 9.52% del grupo NRD, 13.33% en RDNP y 15% en el RDP (Gráfica 1). El análisis por alelos tampoco mostro diferencias significativas entre los grupos, encontrando el alelo G en el 88% de los pacientes con NRD, 80% en los casos con RDNP y 82% en el grupo RDP (Gráfica 2).

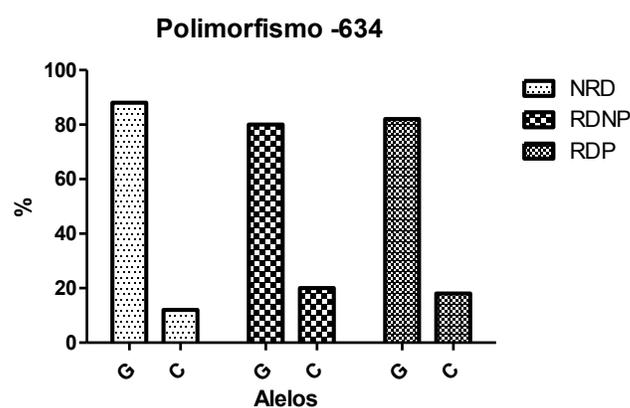
POLIMORFISMO -634 G>C

| GENOTIPO (%) | NRD (n=21) | RDNP (n=15) | RDP (n=20) | p |
|--------------|------------|-------------|------------|------|
| GG | 18 (85.71) | 11 (73.33) | 16 (80) | 0.82 |
| GC | 1 (4.76) | 2 (13.33) | 1 (5) | |
| CC | 2 (9.52) | 2 (13.33) | 3 (15) | |
| ALELOS (%) | | | | |
| G | 37 (88) | 24 (80) | 33 (82) | 0.62 |
| C | 5 (12) | 6 (20) | 7 (18) | |

Tabla 2: Análisis genotípico y alélico del polimorfismo -634 G>C. NDR (No retinopatía diabética), RDNP (Retinopatía diabética no proliferativa), RDP (Retinopatía diabética proliferativa). *p < 0.05 fue considerada como estadísticamente significativo.



Gráfica 1: Análisis genotípico, no hay diferencias estadísticamente significativas (p = 0.822)



Gráfica 2: Análisis alélico, no hay diferencias estadísticamente significativas (p = 0.62)

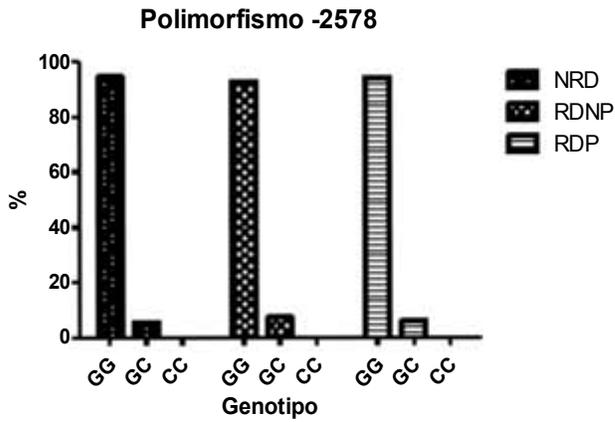
Polimorfismo -2578

Análisis genético y alélico

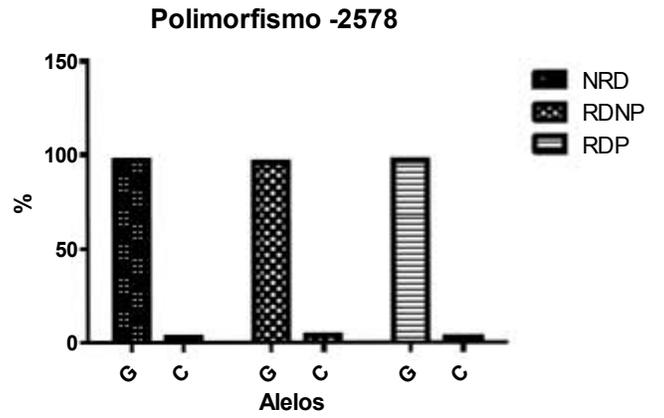
Se estudió el polimorfismo C>A en la región -2578 del gen VEGF sin encontrar una diferencia significativa en los grupos ($p=0.98$) (Tabla 3). La distribución del genotipo GG fue del 94.44% en el grupo NRD, 92.86% en el grupo RDNP y 94.12% para los casos con RDP. No se encontró el alelo CC ni el C>A reportado previamente en la literatura (Gráfica 3). El análisis por alelos tampoco mostro diferencias significativas entre los grupos encontrando el alelo G en el 97% de los pacientes sin retinopatía diabética, 96% con RDNP y 97% con RDP (Gráfica 4).

| POLIMORFISMO -2578 G>C | | | | |
|------------------------|------------|-------------|------------|------|
| GENOTIPO (%) | NRD (n=18) | RDNP (n=14) | RDP (n=17) | p |
| GG | 17 (94.44) | 13 (92.86) | 16 (94.12) | 0.98 |
| GC | 1 (5.56) | 1 (7.14) | 1 (5.88) | |
| CC | 0 | 0 | 0 | |
| ALELOS (%) | | | | |
| G | 35 (97) | 27 (96) | 33 (97) | 0.98 |
| C | 1 (3) | 1 (4) | 1 (3) | |

Tabla 3: Análisis genotípico y alélico del polimorfismo -2578 G>C. NDR (No retinopatía diabética), RDNP (Retinopatía diabética no proliferativa), RDP (Retinopatía diabética proliferativa). * $p < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativo.



Gráfica 3: Análisis genotípico, no hay diferencias estadísticamente significativas ($p=0.98$)



Gráfica 4: Análisis alélico, no hay diferencias estadísticamente significativas ($p=0.98$)

Discusión

En un estudio realizado por Awata y cols (2002)¹² se estudió al polimorfismo -634 en 268 pacientes japoneses con diagnóstico de diabetes y 184 pacientes sanos a manera de controles. Los pacientes se dividieron, al igual que en nuestro estudio, en 3 grupos: no retinopatía diabética, RDNP y RDP. Se reportó una asociación estadísticamente significativa con el alelo C encontrándolo en mayor frecuencia en pacientes con retinopatía diabética contra aquellos sin ella. La razón de momios para el genotipo CC contra el GG fue de 3.20, en el estudio que aquí se presenta no se pudieron validar los resultados y tampoco se consideró útil obtener una razón de momios al no haber encontrado un valor estadísticamente significativo.

Por otra parte los resultados obtenidos en cuanto al polimorfismo -634 si coinciden con lo reportado por Nakamura y cols (2009)¹⁶ en población japonesa (469 pacientes) donde tampoco se encontró correlación estadística con retinopatía diabética proliferativa, también con lo reportado en población india por Uthra y cols (2008)⁹ donde a pesar de reportar un riesgo incrementado (Razón de momios de 1.66 de desarrollar RD) este no fue estadísticamente significativo. Este estudio mencionado reclutó una cohorte de 213 pacientes dividiéndolos de acuerdo al grado de retinopatía diabética.

Por otro lado se contradicen con lo reportado en población polaca por Szaflik y cols (2007)² los cuales reportan una asociación estadísticamente significativa en población caucásica (215 pacientes, usando individuos sin retinopatía diabética como controles) en el polimorfismo -634 G>C y el polimorfismo -460 C>T. Se encontró una mayor prevalencia del alelo C y del genotipo CC en pacientes con RDNP. Al combinar los dos polimorfismos se

reporta un aumento en la prevalencia de la combinación de los genotipos C/G-CC en pacientes con RDP.

En cuanto al polimorfismo -2578 no se encontró la variante reportada C>A en población asiática. En el estudio de Nakamura y cols (2009)¹⁶ se describe el genotipo AA como factor de riesgo para RDP, por otra parte el genotipo CC fue reportado como protector por Chun y cols (2010)¹³ en población coreana. El estudio previo conto con 387 pacientes, y si bien no encontró el genotipo AA como factor de riesgo si la presencia del alelo A. En pacientes sanos y sin RD no hubo diferencias en la distribución de los alelos. Ninguno de los dos resultados se encontró en nuestra muestra. Cabe destacar que el estudio de Nakamura es el más grande reportado hasta el momento.

En un estudio realizado Feghi y cols (2011)¹⁷ en población iraní se analizaron 398 pacientes caucásicos para el polimorfismo +405 G>C encontrando diferencias estadísticamente significativas en el alelo G al comparar el grupo con RDP contra el de NRDP y el genotipo GG fue un factor predictor independiente para RDP al compararlo con el genotipo CC. No se realizó este polimorfismo en nuestro estudio por lo que sería relevante analizarlo con nuestra muestra.

Se encontraron dos meta-análisis realizados por Xiu-Jing y cols (2016)⁷ y Han y cols (2014)³ centrados en los 5 polimorfismos más estudiados. Mismos que corroboran los hallazgos de este trabajo en cuanto a los dos polimorfismos estudiados.

En el estudio realizado por Han y colaboradores como criterios de inclusión se agregaron estudios donde los controles fueran pacientes con diagnóstico de DM sin RD y como casos los pacientes con distintos grados de retinopatía. Las etnicidades encontradas fueron clasificadas como Blanco o asiático. En su estudio se encontraron 7 estudios relevantes

agrupando 1085 casos y 1019 controles para -634G>C y 887 casos y 981 controles para -2578C>A.

Se reporta que en el análisis no se encuentra relación estadísticamente significativa con los polimorfismos -634 G>A y -2578 C>A como lo encontrado en nuestro trabajo. Los estudios se centraron en poblaciones caucásicas y asiáticas sin haber encontrado los autores algún trabajo realizado en población Latina. Por otra parte los polimorfismos +936 G>T y -460 T>C si se asociaron con un mayor riesgo de retinopatía diabética proliferativa, el primero en población asiática.

En cuanto a lo reportado por Xiu-Jing y cols, se incluyeron 16 estudios en el meta-análisis. De estos 4 fueron en población Europea o descendiente de la misma, 8 en población del este de Asia, 3 en chinos Han, 3 en Japón, 2 en Corea, 2 de la India y uno en Egipto. Los resultados concuerdan con lo reportado en el estudio realizado por Han, donde no se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre -634 G>C y los distintos grados de retinopatía, pero si con los polimorfismos +936 encontrando el alelo T como factor de riesgo para progresión y -460 con el alelo C.

Como futura dirección del trabajo, los estudios realizados por Nakamura y por Awata también analizaron muestras de vítreo tanto de pacientes con diabetes como controles sanos. Si bien los estudios fueron contradictorios en sus resultados, de encontrar un polimorfismo relevante se podría complementar con el estudio de niveles de VEGF en el humor vítreo. También es relevante completar el estudio de los otros tres polimorfismos e investigar posibles interacciones entre ellos para tener un panorama más claro del papel que cumplen los polimorfismos de VEGF en la historia natural de la diabetes mellitus, y si lo reportado en otros grupos étnicos se extiende a población latina.

Por otra parte el estudio todavía puede crecer al analizar los 3 polimorfismos faltantes y de encontrar resultados alentadores, ampliar la muestra y en un futuro incluir muestras de humor vítreo de pacientes diagnosticados con retinopatía diabética y medir los niveles de VEGF para analizar la influencia de los polimorfismos en estos valores.

Conclusiones

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos -634 y -2578 con los distintos grados de retinopatía diabética. Sin embargo se encontró un polimorfismo no reportado previamente en estudios de asociación de VEGF con retinopatía diabética, el -2578 G>C y no se encontró el polimorfismo -2578 CC reportado en población japonesa y coreana.

Bibliografía

1. Agarwal A, Soliman MK, Sepah YJ, Do D V., Nguyen QD. Diabetic retinopathy: Variations in patient therapeutic outcomes and pharmacogenomics. *Pharmgenomics Pers Med*. 2014;7:399-409. doi:10.2147/PGPM.S52821
2. Szaflik JP, Wysocki T, Kowalski M, et al. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. *Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;246:39–43. doi:10.1007/s00417-007-0674-6
3. Han L, Zhang L, Xing W, et al. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: A meta-analysis of 11 case-control studies. *J Diabetes Res*. 2014. doi:10.1155/2014/805801
4. Arar NH, Freedman BI, Adler SG, et al. Heritability of the Severity of Diabetic Retinopathy: The FIND-Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):3839-3845. doi:10.1167/iovs.07-1633
5. Hietala K, Forsblom C, Summanen P, Groop P-H. Heritability of Proliferative Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 2008;57:2176-2180. doi:10.2337/db07-1495
6. Chen JL, Luviano DM, Chen JC, Yu F, Sarraf D. Comparison of diabetic retinopathy phenotype between Latinos and Blacks. *J Diabetes Complications*. 2009;23(6):371-375. doi:10.1016/j.jdiacomp.2008.05.001
7. Xie X, Yang Y, Jiang J, Lu Y. Association between the Vascular Endothelial Growth Factor Single Nucleotide Polymorphisms and Diabetic Retinopathy Risk: A Meta-analysis. *J Diabetes*. 2016. doi:10.1111/1753-0407.12480
8. Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003;19(6):442-455. doi:10.1002/dmrr.415
9. Uthra S, Raman R, Mukesh BN, et al. Association of VEGF Gene Polymorphisms with Diabetic Retinopathy in a South Indian Cohort. *Ophthalmic Genet*. 2008;29:11-15. doi:10.1080/13816810701663527
10. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-676. <http://www.nature.com.pbidi.unam.mx:8080/nm/journal/v9/n6/pdf/nm0603-669.pdf>. Accessed April 2, 2017.
11. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009. doi:10.1007/s00417-008-0915-3
12. Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(0012-1797):1635-1639. doi:10.2337/diabetes.51.5.1635

13. Chun M-Y, Hwang H-S, Cho H-Y, et al. Association of Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms with Nonproliferative and Proliferative Diabetic Retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3547-3551. doi:10.1210/jc.2009-2719
14. Fegghi M, Nikzamir A, Esteghamati A, Mahmoudi T, Yekaninejad MS. Relationship of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C polymorphism and proliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Transl Res.* 2011;158(2):85-91. doi:10.1016/j.trsl.2011.03.002
15. Buraczynska M, Ksiazek P, Baranowicz-Gaszczyk I, Jozwiak L. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol Dial Transpl.* 2007;22:827-832. doi:10.1093/ndt/gfl641
16. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247:21-26. doi:10.1007/s00417-008-0915-3
17. Fegghi M, Nikzamir A, Esteghamati A, Mahmoudi T, Yekaninejad MS. Relationship of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C polymorphism and proliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Transl Res.* 2011;158(2):85-91. doi:10.1016/j.trsl.2011.03.002