



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P.**

**“COMPARACIÓN DE NIVELES DE TGF- $\beta$ <sub>1</sub> Y TGF- $\beta$ <sub>2</sub> EN SUERO Y HUMOR  
ACUOSO EN PACIENTES DIABÉTICOS CON Y SIN EDEMA MACULAR.”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**MÉDICO ESPECIALISTA EN OFTALMOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**CLAUDIA ZEPEDA PALACIO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. ANGELES YAHIEL HERNÁNDEZ VÁZQUEZ**

**ASESORES**

**DRA. INGRID YAZMÍN PITA ORTIZ**

**MAESTRA EN CIENCIAS ATZIN ROBLES CONTRERAS.**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2019**



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.

Este trabajo fue realizado en la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz con apoyo del Departamento de Retina y Vítreo, el Departamento de Segmento Anterior y el Laboratorio de Investigación Biomédica bajo la dirección de la Dra. Angeles Yahel Hernández y con la colaboración de la Dra. Ingrid Yazmín Pita Ortiz y la Maestra en Ciencias Atzin Robles Contreras.

"Donde haya un árbol que plantar, plántalo tú. Donde haya un error que enmendar, enmiéndalo tú. Donde haya un esfuerzo que todos esquivan, hazlo tú. Sé tú el que aparta la piedra del camino." Gabriela Mistral

*A mi Mamá Claudia Palacio por ser mi más grande fuente  
de inspiración con su temple, dedicación y fortaleza.*

*A mi Papá Luis Fernando Zepeda por haberme enseñado a  
encontrar la felicidad en el amor y entrega a las demás personas.*

*A mi hermano Luis por compartir conmigo el camino.*

*A mis amigos y familia que llenan mi vida de amor y alegría.*

*A mis maestros por enseñarme y regalarme lo más preciado que  
una persona puede dar que es un pedacito de sí mismos.*

Agradezco el apoyo y colaboración de mis compañeros residentes y de los becarios del departamento de Segmento Anterior y el departamento de Retina y Vítreo por ayudarme con el proceso de reclutamiento y toma de muestras de humor acuoso.

Agradezco el apoyo y colaboración de mi compañero y amigo Andric Christopher Pérez Ortiz por su ayuda y asesoría.

## ÍNDICE

<b>PRESENTACIÓN</b>	7
<b>RESUMEN</b>	9
<b>ABSTRACT</b>	11
<b>MARCO TEÓRICO</b>	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
JUSTIFICACIÓN	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS GENERALES	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	19
DISEÑO DEL ESTUDIO	19
COLECCIÓN DE MUESTRAS	22
CUANTIFICACIÓN DE TGF- $\beta$ 1 y - $\beta$ 2 POR ELISA	23
VARIABLES DEL ESTUDIO	24
TAMAÑO DE LA MUESTRA	24
PLAN ESTADÍSTICO	25
<b>RESULTADOS</b>	27
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	27

Tabla 1. Descripción de la muestra (n = 53).	27
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTRATIFICADA POR EDEMA MACULAR DIABÉTICO	30
Tabla 2. Descripción de la muestra estratificada por edema macular a,†,* (n = 53).	33
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE TGF-β1 Y -β2 EN PLASMA Y HUMOR ACUOSO, ESTRATIFICADOS POR EDEMA MACULAR	34
Figura 1. Correlación gráfica entre la concentración de TGF-β1 Y -β2 en plasma y humor acuoso estratificado por edema macular.	34
Tabla 3. Correlación entre la concentración de TGF-β1 Y -β2 en plasma y humor acuoso estratificado por edema macular.	36
Tabla 4. Asociación entre la concentración en humor acuoso de TGF-β1-2 y parámetros clínicos.	37
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE TGFβ 1 Y 2 EN SUERO Y HUMOR ACUOSO CON RESPECTO AL GROSOR MACULAR CENTRAL.	38
Figura 2. Relación lineal entre el grosor macular (μm) y la expresión de TGF-β1 Y -β2 en pacientes con edema macular (n = 26)	39
Figura 3. Relación lineal entre el grosor macular (μm) y la expresión de TGF-β1 Y -β2 en pacientes con edema macular estratificado por subtipos (n = 26)	40
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>45</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>49</b>

# PRESENTACIÓN

## Título

Comparación de niveles de TGF- $\beta_1$  y TGF- $\beta_2$  en suero y humor acuoso en pacientes diabéticos con y sin edema macular.

## Investigadores

### Investigador responsable

Dra. Claudia Zepeda Palacio.

### Director de Tesis

Dra. Ángeles Y Hernández Vázquez.

*Médico Cirujano Oftalmólogo, Especialista en Retina y Vítreo. Adscrito del Departamento de Alta Especialidad en Retina y Vítreo. Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz.*

### Asesores

MC Atzin Robles Contreras.

*Maestra en Ciencias. Jefa del Área de Inmunoproteómica Ocular del Centro de Investigación Biomédica. Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz.*

Dra. Ingrid Yazmín Pita Ortiz

*Médico Cirujano Oftalmólogo, Especialista en Retina y Vítreo. Adjunto del Departamento de Alta Especialidad en Retina y Vítreo. Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz.*

### **Periodo de realización**

Marzo del 2018 a Mayo del 2019

### **Correspondencia**

Departamento de Retina y Vítreo.

Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

Ezequiel Montes 135 Colonia Tabacalera, Cuauhtémoc, Ciudad de México.

## RESUMEN

### Objetivo

Evaluar si existen diferencias significativas en los niveles de expresión de TGF- $\beta_1$  y - $\beta_2$  en plasma y humor acuoso (HA) de pacientes con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) con y sin edema macular diabético (EMD).

### Metodología

Estudio de casos y controles. Se reclutaron pacientes diabéticos con diagnóstico de RDNP. Los casos fueron pacientes con reciente diagnóstico de EMD en proceso de iniciar tratamiento antiangiogénico. Los controles fueron pacientes sin EMD sometidos a un procedimiento de facoemulsificación por catarata senil. Posterior a la firma del consentimiento informado, medimos para cada caso y control agudeza visual con cartilla de ETDRS, realizamos una exploración clínica con clasificación de LOCS III y estadificación de RDNP, tomografía de coherencia óptica (OCT) macular, hemoglobina glucosilada (HbA1c). Recolectamos aproximadamente 20  $\mu$ L de muestra de suero y humor acuoso. Se realizó la cuantificación de la concentración de TGF- $\beta_1$  y - $\beta_2$  en ambos medios por ELISA. Para el análisis de datos, realizamos una T de Student y regresiones lineales para ajustar nuestros resultados con SAS V 9.4. Toda nuestra experimentación y reclutamiento fue aprobado por el comité de bioética del Hospital de la Luz I.A.P.

## Resultados

La muestra fue de 53 pacientes, 27 en el grupo de casos y 26 en el grupo control. No encontramos una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  en humor acuoso y sérico, lo que sugiere que el efecto generado por estas citocinas en el humor acuoso de pacientes con EMD es un proceso local. Al ajustar nuestros resultados mediante una regresión lineal multivariada, la concentración en humor acuoso de TGF- $\beta_1$  es significativamente mayor en los casos con respecto a los controles con una diferencia promedio de 434.6 ( $\pm 151.6$  DE) ( $p = 0.007$ ). Los niveles de TGF- $\beta_2$  en humor acuso tras el ajuste no fueron significativos ( $p = 0.4240$ ). A pesar de estos resultados, no encontramos una relación proporcional y significativa entre los niveles de expresión de TGF- $\beta_1$  y el grosor macular central.

## Conclusiones

Nuestros hallazgos sugieren que los niveles de TGF- $\beta_1$  se encuentran aumentados en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa y edema macular. La capacidad predictiva de TGF- $\beta_1$  amerita estudio posterior.

## Palabras clave

Retinopatía diabética; Edema macular diabético; *Transforming-growth factor - $\beta_1$  & 2*.

## ABSTRACT

### Aim

To assess the relationship between TGF- $\beta_1$  and - $\beta_2$  expression levels in plasma and aqueous humor (HA) of patients with non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) with and without diabetic macular edema (DME).

### Methods

This is a case-control study. We recruited diabetic patients with NPDR diagnosis. Cases had a recent diagnosis of DME and were starting an antiangiogenic treatment. Controls were patients without DME undergoing phacoemulsification for senile cataracts. We measured for each eligible participant visual acuity, performed a clinical exam, LOCS-III and RDNP staging, macular OCT, HbA1c, and collected approximately 20  $\mu$ L of serum and aqueous humor samples. We measured the concentration of TGF- $\beta_1$  and - $\beta_2$  in both media by ELISA. For our statistical approach, we performed a Student's T-test and linear regressions to adjust our results with SAS V 9.4. Our IRB approved all our experimentation and recruitment at Hospital de la Luz I.A.P.

### Results

The total population was 53 patients, 27 cases and 26 controls. We failed to detect a statistically significant correlation between the levels of TGF- $\beta_1$  and - $\beta_2$  in humor

aqueous and serum, which suggests that the effect generated by these cytokines in the aqueous humor of patients with DME is a localized process. The aqueous humor concentration of TGF- $\beta_1$  is significantly higher in DME cases compared to controls (Mean difference:  $434.6 \pm 151.6$  SD) ( $p = 0.007$ ). TGF- $\beta_2$  levels in aqueous humor after statistical adjustment were not significant ( $p = 0.4240$ ). Despite these results, we did not find a proportional and meaningful relationship between the expression levels of TGF- $\beta_1$  and central macular thickness.

## **Conclusions**

Our findings suggest that aqueous humor TGF- $\beta_1$  expression levels are elevated in patients with nonproliferative diabetic retinopathy and macular edema. The predictive capacity of TGF- $\beta_1$  warrants further study.

## **Keywords**

Non-proliferative diabetic retinopathy; diabetic macular edema; *Transforming-growth factor - $\beta_1$  & 2*.

## MARCO TEÓRICO

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad altamente prevalente en la población adulta de México. Aproximadamente 9.2% de la población es afectada por algún fenotipo.<sup>1</sup> Entre las complicaciones de la diabetes mellitus 2, las más frecuentes e importantes en calidad de vida y atención en salud son las microvasculares, entre ellas las oftalmológicas.<sup>2,3</sup> 47.6% de la población diabética en México reporta disminución en la agudeza visual, con diagnóstico de retinopatía diabética en 13.9% y en un 6.6% pérdida significativa de la visión.<sup>1</sup>

El edema macular diabético (EMD) es la principal causa de baja visual en pacientes con retinopatía diabética, presente en 7.4% de los casos.<sup>4</sup> La incidencia a 4 años en pacientes diabéticos latinos es alrededor de 5.4% para edema macular diabético no significativo y 34.0% en edema macular diabético significativo<sup>5</sup>, aumenta en función del control metabólico (especialmente glucemia),<sup>6</sup> tiempo de evolución y estadio clínico.<sup>7</sup> Los factores de riesgo mayormente asociados al edema macular son tiempo de evolución, hiperglicemia crónica y la asociación con hipertensión arterial e hiperlipidemia.<sup>8</sup>

La hiperglicemia es el pilar de la fisiopatología al inducir daño por 4 vías metabólicas: 1) la vía de los polioles, 2) la generación de productos de glucosilación avanzada, 3) la vía mediada por proteína cinasa C, y 4) por la vía de la hexosamina. El aumento en actividad de alguna de éstas vías metabólicas genera estrés oxidativo, inflamación y difusión vascular con una regulación a la alta de factores de

crecimiento y citocinas que condicionan daño en la barrera hematorretiniana (BHR) y el subsecuente edema macular.<sup>8,9,10,11</sup> De igual manera, se generan cambios en la matriz extracelular y en la red vascular que aumenta la rigidez de éstos tejidos e incrementa aún más el estrés oxidativo, promoviendo apoptosis de pericitos y edema macular.<sup>12</sup>

Los pericitos son células de músculo liso modificadas con propiedades contráctiles ubicadas en la periferia de la membrana basal vascular. Dado que regulan flujo capilar retiniano, cualquier daño celular produce extravasación y edema.<sup>7,13</sup> En pacientes con retinopatía diabética se ha descrito que la disminución de la población celular de pericitos correlaciona con la pérdida de la integridad de la barrera hematorretiniana interna.<sup>14</sup> Aún más, en modelos murinos, el fenotipo de retinopatía diabética con edema macular es reproducible a partir de la pérdida de al menos 50% de ésta población celular.<sup>15</sup>

La patogénesis de la muerte celular de pericitos es compleja y esta mediada por múltiples vías fisiopatológicas, sin embargo se ha demostrado que varias citocinas in vitro e in vivo favorecen su desarrollo. El factor transformador de crecimiento beta (TGF- $\beta$ , TGF-B) es una citocina secretada por macrófagos, especialmente en condiciones de hiperglucemia, que promueve la síntesis de proteínas pro-apoptóticas como BIGH3.<sup>16</sup> El efecto neto es el daño a la BHR al incrementar su permeabilidad y condicionar apoptosis de pericitos. La viabilidad celular en este medio es dosis dependiente.<sup>16</sup> Betts-Obregon y colaboradores demostró en cultivos celulares de pericitos humanos que el aumento de expresión de TGF- $\beta$ 1 genera apoptosis de los mismos. Además, correlaciona con una regulación a la alta del gen

*TGFBI*, que codifica para la proteína inducida por TGF- $\beta$ , de la clona humana gen 2 (*BIG3*). Esta proteína induce la muerte celular y con ello depleta aún más la población celular de pericitos.<sup>17</sup> En cultivos celulares de pericitos de monos Rhesus, TGF- $\beta$  favorece en apoptosis de pericitos y expresión de *BIGH3*. Además, hay un incremento lineal de la apoptosis al aumentar la expresión de *BIGH3* en el medio. Estos efectos pueden ser disminuidos con anticuerpos monoclonales dirigidos a estas proteínas.<sup>18</sup> Por lo anterior, TGF- $\beta$  es una citocina con un potencial gran impacto e implicación importante dentro de la fisiopatología de la retinopatía diabética.

El edema macular es mediado principalmente por una pérdida de la BHR con fuga de plasma y lípidos al área macular, condicionando un aumento del grosor de la misma con la consecuente baja visual.<sup>8</sup> Para su estadificación el Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) clasificó el edema macular como clínicamente significativo con alguna de las siguientes condiciones:

1. Engrosamiento dentro de las 500 micras centrales de la mácula.
2. Exudados duros dentro de las 500 micras centrales de la macula asociado a aumento del grosor de la retina adyacente.
3. Aumento del grosor de la retina de al menos 1 diámetro de disco a una distancia menor de 1 diámetro de disco del centro de la macula.<sup>19</sup>

Posteriormente, la clasificación internacional simplificada de edema macular diabético clasificó el edema macular en: leve cuando hay edema o lípidos en el polo posterior pero están distantes al centro de la mácula; moderado cuando el edema o

lípidos están cercanos al centro de la mácula pero no lo involucran; y severo cuando hay edema o lípidos involucrando el centro macular.<sup>20</sup> El diagnóstico de edema macular diabético es clínico. Métodos adicionales como la tomografía de coherencia óptica son de gran ayuda para la valoración del grosor macular central (especialmente para el seguimiento y valoración de la respuesta a tratamiento)<sup>21</sup> y la fluorangiografía para valorar los sitios de fuga en edema macular focal.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El edema macular diabético es la primera causa de baja visual en pacientes con retinopatía diabética. Aunque la fisiopatología del edema macular es compleja, hay reportes de citocinas que aumentan la apoptosis de pericitos y con ello promueven su desarrollo. Actualmente sólo hay evidencias de éstos efectos in vitro. TGF- $\beta$  es una citocina significativamente asociada con la muerte celular de pericitos; sin embargo no existe ningún estudio que analice éstos efectos in vivo. Por tanto realizamos un estudio transversal para examinar si existen diferencias significativas en los niveles séricos y en humor acuoso de TGF- $\beta$  entre pacientes diabéticos con y sin edema macular.

## **JUSTIFICACIÓN**

El edema macular diabético (EMD) es la primera causa de baja visual en pacientes con retinopatía diabética y su fisiopatología va ligada con la pérdida de la integridad

de la barrera hematorretiniana (BHR). Dentro de la cadena fisiopatológica de la retinopatía diabética, la pérdida de los pericitos vasculares correlaciona con alteraciones de la BHR. Actualmente hay evidencia in vitro de que TGF- $\beta$  es una citocina altamente asociada en este proceso pero no hay evidencias in vivo.<sup>19, 20, 21</sup> Por tanto es necesario el estudio sistemático en pacientes con retinopatía diabética y edema macular para caracterizar el rol clínico de esta citocina. Los resultados preliminares de este proyecto podrían ser incentivar a la investigación farmacéutica como blanco terapéutico para mejorar el pronóstico visual en casos de retinopatía diabética con EMD.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

En pacientes con retinopatía diabética no proliferativa, ¿Existe una correlación entre los niveles de TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 en suero y humor acuoso entre casos y controles de edema macular diabético?

### *Desglose*

Población: Pacientes con retinopatía diabética no proliferativa.

Exposición: Diagnóstico clínico de edema macular diabético.

Comparación: Casos sin edema macular.

Outcome/desenlace: Expresión en plasma y humor acuoso de TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2.

## **HIPÓTESIS**

1. El edema macular diabético está asociado con niveles séricos y en humor acuoso elevados de TGF- $\beta$ 1 y - $\beta$ 2.
2. Existe una correlación positiva entre el grosor macular y los niveles séricos y en humor acuoso de TGF- $\beta$ 1 y - $\beta$ 2.

## **OBJETIVOS GENERALES**

1. Comparar los niveles de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en sangre y humor acuoso de pacientes diabéticos con retinopatía diabética no proliferativa, con y sin edema macular.
2. Correlacionar el grosor macular central con los niveles séricos y en humor acuoso de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Contrastar los niveles de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en plasma de pacientes diabéticos con retinopatía diabética no proliferativa, sin y con edema macular.
2. Analizar si existen diferencias significativas en los niveles de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en plasma y humor acuoso de pacientes diabéticos con retinopatía diabética no proliferativa, sin y con edema macular.
3. Establecer si existe una correlación entre el grosor macular central y los niveles de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en sangre y humor acuoso.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## DISEÑO DEL ESTUDIO

Realizamos un estudio transversal en pacientes de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P. reclutados entre Abril/2018 a Mayo/2019. Todos los candidatos al estudio aceptaron participar tras firmar un consentimiento informado. Todos nuestros procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki y éste protocolo fue sometido a aprobación por el Comité de Ética del hospital sede. Nuestros criterios de inclusión se detallan a continuación:

**Grupo A: Casos diagnosticados con retinopatía diabética no proliferativa con edema macular**

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Diagnóstico de diabetes mellitus 2 soportado por las guías de la ADA.
- Retinopatía diabética no proliferativa estadificada clínicamente de acuerdo a las guías del ETDRS modificado.
- Edema macular diabético clínico y demostrado con tomografía de coherencia óptica.

Criterios de no inclusión

- Retinopatía diabética proliferativa.
- Pacientes con diagnóstico de enfermedades inflamatorias sistémicas.

- Pacientes que hayan recibido previamente un tratamiento con intravítreos o cirugía de retina.
- Diabetes Mellitus tipo 1.
- Menores de 18 años.
- Rechazo al consentimiento informado.

#### Criterios de eliminación

- Muestras séricas o de humor acuoso sin calidad/cantidad necesaria para el análisis bioquímico.
- Estudios que demuestren alteraciones anatómicas congruentes con otra patología.

#### Descripción operativa:

Reclutamos pacientes programados para aplicación de antiangiogénico por edema macular diabético primera dosis quienes recibieron información sobre el protocolo y fueron invitados a participar. Aquellos que aceptaron, firmaron el formato de consentimiento informado previa explicación del proyecto y autorizaron la toma de muestras. Se realizó captura de OCT macular previo a toma de muestra. Para la muestra de humor acuoso se realizó una paracentesis de cámara anterior previa a la aplicación del antiangiogénico y se tomó una muestra de sangre venosa periférica. Se realizaron determinaciones séricas de glucosa, HbA1c, TGF- $\beta$ 1 y - $\beta$ 2 en el centro de investigación biomédica del hospital sede. Las determinaciones

bioquímicas se realizaron conforme a protocolos estandarizados y se detallan más adelante.

**Grupo B: Casos diagnosticados con retinopatía diabética no proliferativa sin evidencia de edema macular**

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Diagnóstico de diabetes mellitus 2 soportado por las guías de la ADA.
- Retinopatía diabética no proliferativa estadiada clínicamente de acuerdo a las guías del ETDRS modificado.
- Sin evidencia clínica de edema macular diabético y demostrado con tomografía de coherencia óptica.
- Sin enfermedades inflamatorias sistémicas.
- Candidatos a facoemulsificación por catarata.

Criterios de no inclusión: Mismos que el grupo A.

Criterios de exclusión: Mismos que el grupo A.

Criterios de eliminación: Mismos que el grupo A.

**Descripción operativa:**

Reclutamos pacientes del Departamento de Segmento Anterior programados para cirugía de catarata, con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 sin evidencia de

edema macular. Recibieron información sobre el protocolo y fueron invitados a participar. Aquellos que aceptaron, firmaron el formato de consentimiento informado, dando información y recibiendo autorización para la toma de muestra. Se realizó toma de imágenes de tomografía de coherencia óptica macular previo a toma de muestras. La toma de muestra de humor acuoso se realizó previo al tiempo quirúrgico posterior a la realización del puerto principal y se tomó una muestra de sangre venosa periférica previo al procedimiento quirúrgico. Se realizaron determinaciones séricas de glucosa, HbA1c, TGF- $\beta$ 1 y - $\beta$ 2 en el centro de investigación biomédica del hospital sede. Las determinaciones bioquímicas se realizaron conforme a protocolos estandarizados y se detallan más adelante.

## **COLECCIÓN DE MUESTRAS**

Las muestras de humor acuoso fueron tomadas en ambos grupos utilizando una cánula de 27 gauges en una jeringa de insulina, tratando de tomar un volumen de 50  $\mu$ L. Las muestras se congelaron posteriormente a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Las muestras de sangre periférica se procesaron en un periodo de 24 horas para las determinaciones de hemoglobina glicosilada. Las muestras para determinación sérica de TGFB1 y 2 se centrifugaron el día de la toma y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su procesamiento. Para el procesamiento de las muestras, se descongelaron a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a su procesamiento.

## **CUANTIFICACIÓN DE TGF- $\beta$ 1 y - $\beta$ 2 POR ELISA**

Activación de las muestras. Las muestras se activaron previo al ELISA, colocando 40 $\mu$ L de muestra y adicionando 20 $\mu$ L de HCl 1N. Se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se neutralizaron adicionando 20 $\mu$ L de NaOH 1.2N y HEPES 0.5M. Posteriormente se realizó la dilución de la muestra 1:20 con el calibrador RD5-53 (diluido 1:4).

Posteriormente se adicionaron 50 $\mu$ L del diluyente RD1-73 a cada pozo, se agregó el estándar o la muestra activada (50 $\mu$ L) y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavó la placa 3 veces con 400 $\mu$ L de buffer de lavado. A continuación se adicionó el conjugado de TGF $\beta$ 1 o TGF $\beta$ 2 según el caso a cada pozo y se incubó nuevamente por 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se lavó nuevamente y se agregaron 100 $\mu$ L de solución sustrato; se procedió a un tiempo de incubación por 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz; transcurrido este tiempo se agregaron 100 $\mu$ L de la solución de paro y se procedió a la lectura de la placa a una longitud de onda de 450nm en un lector de ELISA (Biotek). Finalmente, se calculó la concentración usando una curva tipo, realizando una regresión lineal del estándar de la citocina recombinante y tomando en cuenta las diluciones correspondientes (factor de dilución = 20).

## **VARIABLES DEL ESTUDIO**

### Dependiente:

Niveles séricos y en humor acuoso de TGF $\beta$ -1 y -2 [Continua]

### Independientes:

Fenotipo de edema macular [Binario, Si/No]: principal interés

Edad [Continua]

Sexo [Binario, Si/No]

Hipertensión [Binario, Si/No]

Estadio de retinopatía diabética [Categórica]

Grosor macular central [Continua]

Niveles séricos de glucosa [Continua]

Niveles séricos hemoglobina A1C (HbA1c) [Continua]

## **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Dado que los reportes actuales no proporcionan medias o desviaciones estándar con las cuales estimar el tamaño de muestra necesario, realizamos un muestreo por conveniencia donde se invitó a participar a todos los pacientes que cumplieran con

los criterios de inclusión obteniendo el número de pacientes reportados en nuestra muestra.

## PLAN ESTADÍSTICO

Se registraron todas las variables (dependientes e independientes) en una base estándar para su análisis. Se describió la muestra completa con medias, y porcentajes para variables continuas y proporciones para categóricas (**Tabla 1**). Verificamos la normalidad de los datos gráficamente (con histogramas) y con análisis univariados (Skewness, Kurtosis). En función de la normalidad, los datos que significativamente tuvieron una distribución no normal fueron transformados con el método que mejor acomodó (sea logarítmico, exponencial, inverso, etc.). Después con T de Student probamos si existe alguna diferencia significativa entre los niveles de TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  en sangre y humor acuoso de pacientes diabéticos con retinopatía diabética no proliferativa, sin y con edema macular. (**Tabla 2**) De igual forma con la prueba de Pearson buscamos la correlación entre la concentración en humor acuoso de TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  y plasma para evaluar la independencia de los valores sistémicos (niveles séricos) del local (humor acuoso) (**Tabla 3 y Figura 1**). Adicionalmente, ajustamos nuestras asociaciones con modelos de regresión lineal multivariada tomando en cuenta factores confusores importantes para este caso (**Tabla 4**). Todos los modelos siguieron la forma de:  $TGF-\beta_1 Y -\beta_2 \sim Covariable 1 + \dots + \varepsilon$ ; donde los niveles de TGF- $\beta_1$  y  $\beta_2$  son función del diagnóstico de edema macular y ajustadas por variables con significancia clínica o confusoras. Todos nuestros modelos propuestos siguieron las convenciones estadísticas para regresiones

lineales. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en SAS v.9.4 (comprobado en R v.3.3.2) y los gráficos en Prism v.7.

## RESULTADOS

### DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Reclutamos a 53 pacientes con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP), 27 controles y 26 casos con edema macular diabético (EMD) (**Tabla 1**). En la población total (n = 53), la edad promedio fue de 63.2 años ( $\pm 15.4$  DE) y el 58.5% de la población fueron mujeres, con igual proporción entre casos y controles (**Tabla 2**). El 100% de nuestra muestra fueron pacientes con diabetes mellitus tipo 2, diagnosticados en promedio 13 años ( $\pm 7.3$  DE) atrás. Valoramos el control glucémico midiendo niveles de hemoglobina A1C, encontrando niveles promedio de 7.7% ( $\pm 1.6$  DE) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Descripción de la muestra (n = 53).

Características	N (%) *,†
<u>Demográficas</u>	
Edad (Años), $\bar{x} \pm s$	63.2 $\pm$ 15.4
Sexo	
Mujeres	31 (58.5)
Hombres	22 (41.5)
<u>Comorbilidades clínicas</u>	
Diabetes mellitus tipo II	53 (100.0)
Evolución clínica (Años), $\bar{x} \pm s$	13.0 $\pm$ 7.3
Uso de insulina	15 (28.3)
Uso de metformina	42 (79.3)
HbA1c (%), $\bar{x} \pm s$	7.7 $\pm$ 1.6

## Hipertensión esencial

Evolución clínica (Años), $\bar{x} \pm s$	10.0 $\pm$ 6.4
Uso de antihipertensivos orales	26 (49.1)

## Comorbilidades oculares

### Severidad de la RDNP

#### Ojo derecho

Temprana	20 (37.7)
Moderada	17 (32.1)
Severa	16 (30.2)

#### Ojo izquierdo

Temprana	21 (39.6)
Moderada	17 (32.1)
Severa	15 (28.3)

### Catarata

#### Ojo derecho LOCS, $\bar{x} \pm s$

Color nuclear	2.3 $\pm$ 1.0
Opalescencia nuclear	2.3 $\pm$ 1.0
Cortical	1.6 $\pm$ 1.0
Subcapsular posterior	1.4 $\pm$ 1.2

#### Ojo izquierdo LOCS, $\bar{x} \pm s$

Color nuclear	2.3 $\pm$ 1.0
Opalescencia nuclear	2.3 $\pm$ 1.0
Cortical	1.7 $\pm$ 1.1
Subcapsular posterior	1.6 $\pm$ 1.2

## Hallazgos del OCT

### Ojo derecho

Fondo normal	29 (57.8)
Cambios espongiiformes	9 (17.3)
Cambios quísticos	13 (25.0)
Exudados/Drusas	1 (1.9)
Ojo izquierdo	
Fondo normal	33 (62.3)
Cambios espongiiformes	8 (15.1)
Cambios quísticos	10 (18.9)
Exudados/Drusas	2 (3.8)
<u>Grosor macular por OCT (<math>\mu\text{m}</math>), <math>\bar{x} \pm s</math></u>	
Ambos ojos	309.4 $\pm$ 108.1
Ojo derecho	320.9 $\pm$ 98.7
Ojo izquierdo	298.0 $\pm$ 116.6
<u>Variable dependientes del estudio</u>	
Edema macular	26 (46.1)
TGF- $\beta_1$ (pg/mL), $\bar{x} \pm s$	
Plasma	43180.4 $\pm$ 12950.6
Humor acuoso	4181.0 $\pm$ 444.7
Humor:Plasma (%)	12.4 $\pm$ 13.4
TGF- $\beta_2$ (pg/mL), $\bar{x} \pm s$	
Plasma	845.2 $\pm$ 141.5
Humor acuoso	1462.4 $\pm$ 171.8
Humor:Plasma (%)	178.1 $\pm$ 38.8

---

Notas al pie de tabla (Tabla 1):

\* Es posible que los números no sumen los totales debido a datos faltantes y que los porcentajes de las columnas no se sumen al 100% debido al redondeo.

†: Datos imputados mediante *bagging of regression trees*.

RDNP: Retinopatía diabética no proliferativa; TGF: Transforming growth factor, HbA1c: Hemoglobina A1c, OCT: Optical coherence tomography; Humor:Plasma (%): Razón de la concentración de TGF en humor acuoso a su concentración en plasma.

Cuantificamos la expresión de TGF- $\beta_1$  y - $\beta_2$  en nuestra muestra; en 6 casos (23.1%) y en 7 controles (25.9%) no fue posible realizar el ensayo. Por tanto, para no perder poder estadístico imputamos los datos faltantes usando *bagging tree-regressions*. Los datos imputados conservaron su misma distribución. En la muestra total (n = 53), la concentración promedio de TGF- $\beta_1$  en plasma fue de 44245.6 pg/mL ( $\pm$  14794.5 DE) y en humor acuso de 4190.6 ( $\pm$ 513.1 DE) (**Tabla 1**). La concentración promedio de TGF- $\beta_2$  en plasma fue de 853.8 ( $\pm$  162.5 DE) y en humor acuso de 1461.6 ( $\pm$  200.9 DE) (**Tabla 1**). La descripción completa de la muestra se encuentra en la Tabla 1.

## DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTRATIFICADA POR EDEMA MACULAR DIABÉTICO

Para evaluar las variables significativamente asociadas con el estado de caso o control y susceptibles a ajustarse en los análisis multivariados, estratificamos la Tabla 1 por edema macular (**Si vs. No, Tabla 2**). La concentración en humor acuoso de TGF- $\beta_1$  fue significativamente mayor en los casos, en promedio los pacientes con edema macular exceden con 582.0 pg/mL ( $\pm$  425.5 DE) a los controles ( $p < 0.001$ ). En plasma, los controles tienen una mayor expresión de TGF- $\beta_1$  en promedio de 10292.0 pg/mL ( $\pm$ 12027.2 DE) ( $p = 0.0258$ ) (**Tabla 2**). De igual manera,

la concentración en humor acuoso de TGF- $\beta_2$  fue significativamente mayor en los casos con respecto a los controles con una diferencia promedio de 149.6 pg/mL ( $\pm 188.6$  DE) ( $p = 0.0180$ ) (**Tabla 2**). No encontramos diferencias significativas entre la concentración de TGF- $\beta_2$  en plasma de casos y controles. (**Tabla 2**)

**Tabla 2.** Descripción de la muestra estratificada por edema macular <sup>a,b,c</sup> (n = 53).

Características	Edema macular		Dif. media ± DE <sub>b</sub>	P <sup>c</sup>
	Si (N = 26)	No (N = 27)		
<b>TGF-β<sub>1</sub> (pg/mL), <math>\bar{x} \pm s</math></b>				
Plasma	39285.0 ± 13056.6	46931.5 ± 11905.0	-7646.6 ± 12482.8	<b>0.0302</b>
Humor acuoso	4405.4 ± 469.5	3964.0 ± 291.0	440.5 ± 388.9	<b>0.0002</b>
Humor:Plasma (%)	16.0 ± 18.44	9.0 ± 2.6	6.7 ± 13.0	0.0674
<b>TGF-β<sub>2</sub> (pg/mL), <math>\bar{x} \pm s</math></b>				
Plasma	865.0 ± 127.1	826.2 ± 154.1	38.7 ± 141.5	0.3239
Humor acuoso	1518.4 ± 171.9	1408.4 ± 156.4	110.1 ± 164.2	<b>0.0182</b>
Humor:Plasma (%)	179.7 ± 35.7	176.5 ± 42.3	3.2 ± 39.2	0.7713
<b>Demográficas</b>				
Edad (Años), $\bar{x} \pm s$	65.2 ± 8.8	61.3 ± 19.8	3.9 ± 15.44	0.3619
Sexo				0.2183
Mujeres	13 (50.0)	18 (66.7)		
Hombres	13 (50.0)	9 (33.3)		
<b>Comorbilidades clínicas</b>				
Diabetes mellitus tipo II	26 (100.0)	27 (100.0)		
Evolución clínica (Años), $\bar{x} \pm s$	15.1 ± 6.1	11.0 ± 8.0	4.1 ± 7.1	<b>0.0422</b>
Uso de insulina	8 (30.8)	7 (25.9)		0.6956
Uso de metformina	21 (80.8)	21 (77.8)		0.7884
HbA1c (%), $\bar{x} \pm s$	7.7 ± 1.3	7.7 ± 1.8	0.0 ± 1.6	0.9850
Hipertensión esencial	8.1 ± 5.6	10.9 ± 7.0		
Evolución clínica (Años), $\bar{x} \pm s$	11 (42.3)	15 (55.6)	-2.8 ± 6.3	0.1116
Uso de antihipertensivos orales				0.3348
<b>Grosor macular por OCT</b>				
<b>(μm), <math>\bar{x} \pm s</math></b>				
Ambos ojos				
Ojo derecho	358.6 ± 135.3	262.1 ± 29.8	96.5 ± 97.1	<b>&lt;0.0001</b>
Ojo izquierdo	377.7 ± 100.7	266.2 ± 36.9	111.5 ± 81.8	<b>&lt;0.0001</b>
	339.5 ± 156.0	258.0 ± 20.2	81.5 ± 110.2	<b>0.0138</b>

<u>Comorbilidades oculares</u>				
<b>Severidad de la RDNP</b>				
Ojo derecho				<b>&lt;0.0001</b>
Temprana	1 (3.9)	20 (74.1)		
Moderada	10 (38.5)	7 (25.9)		
Severa	15 (57.7)	0 (0.0)		
Ojo izquierdo				<b>&lt;0.0001</b>
Temprana	1 (3.9)	20 (74.1)		
Moderada	10 (38.5)	7 (25.9)		
Severa	15 (57.7)	0 (0.0)		
<b>Catarata</b>				
<b>Ojo derecho LOCS, <math>\bar{x} \pm s</math></b>				
Color nuclear	1.8 $\pm$ 0.9	2.8 $\pm$ 0.8	-1.0 $\pm$ 0.8	<b>0.0001</b>
Opalescencia nuclear	1.8 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.8	-0.9 $\pm$ 0.9	<b>0.0003</b>
Cortical	1.4 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 1.1	-0.4 $\pm$ 1.0	0.2133
Subcapsular posterior	1.0 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 1.3	-0.8 $\pm$ 1.1	<b>0.0099</b>
<b>Ojo izquierdo LOCS, <math>\bar{x} \pm s</math></b>				
Color nuclear	1.8 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.9	-0.8 $\pm$ 0.9	<b>0.0009</b>
Opalescencia nuclear	1.9 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 0.8	-0.8 $\pm$ 0.9	<b>0.0025</b>
Cortical	1.5 $\pm$ 1.1	1.9 $\pm$ 1.1	-0.4 $\pm$ 1.1	0.2053
Subcapsular posterior	1.1 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 1.3	-1.0 $\pm$ 1.1	<b>0.0018</b>
<b>Hallazgos del OCT</b>				
<b>Ojo derecho</b>				
Fondo normal	2 (8.0)	27 (100.0)		<b>&lt;0.0001</b>
Cambios espongiiformes	9 (36.0)	0 (0.0)		
Cambios quísticos	13 (52.0)	0 (0.0)		
Exudados/Drusas	1 (4.0)	0 (0.0)		
<b>Ojo izquierdo</b>				
Fondo normal	6 (23.1)	27 (100.0)		<b>&lt;0.0001</b>
Cambios espongiiformes	8 (30.8)	0 (0.0)		
Cambios quísticos	10 (38.5)	0 (0.0)		
Exudados/Drusas	2 (7.7)	0 (0.0)		

Notas al pie de tabla (Tabla 2):

\* Es posible que los números no sumen los totales debido a datos faltantes y que los porcentajes de las columnas no se sumen al 100% debido al redondeo.

†: Datos imputados mediante *bagging of regression trees*.

a Los valores de la tabla son medias  $\pm$  desviación estándar para las variables continuas y n (% de columna) para las variables categóricas.

b Dif. media: diferencia media  $\pm$  desviación estándar.

c El valor P es para una prueba T de Student (variables continuas) o una prueba de Chi cuadrada (variables categóricas).

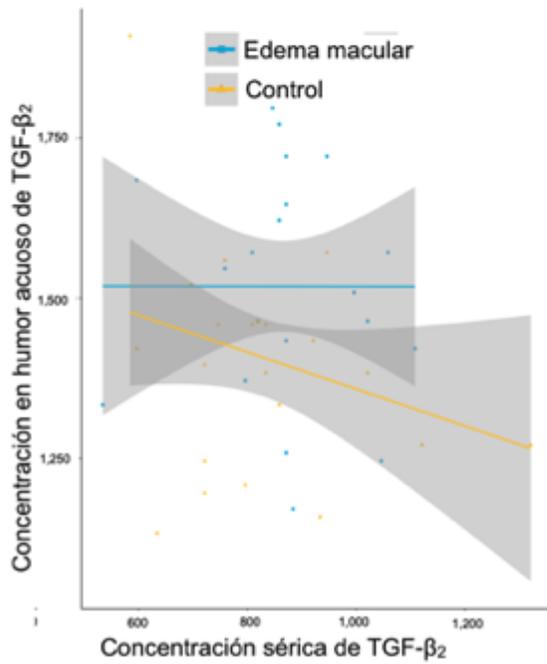
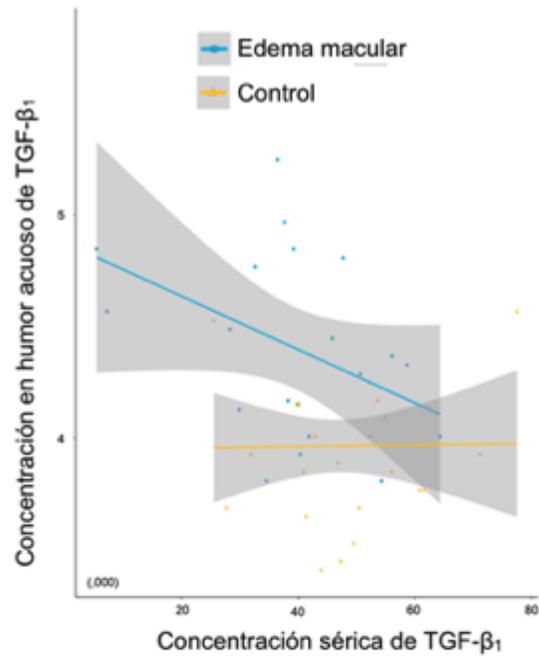
RDNP: Retinopatía diabética no proliferativa; TGF: Transforming growth factor, HbA1c: Hemoglobina A1c, OCT: Optical coherence tomography; Humor:Plasma (%): Razón de la concentración de TGF en humor acuoso a su concentración en plasma.

En promedio los pacientes con edema macular tuvieron un tiempo de evolución mayor de diabetes mellitus respecto a los pacientes sin edema macular, 4.1 años ( $\pm 7.1$  DE) ( $p = 0.0422$ ). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el resto de las variables estudiadas (**Tabla 2**).

## **CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE TGF- $\beta_1$ Y - $\beta_2$ EN PLASMA Y HUMOR ACUOSO, ESTRATIFICADOS POR EDEMA MACULAR**

Estudiamos la relación lineal entre los niveles de TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  en humor acuoso y sérico para correlacionar el estado inflamatorio sistémico con la patología ocular. No encontramos una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables, lo que sugiere que el efecto generado por estas citocinas en el humor acuoso es un proceso local (**Figura 1 y Tabla 3**).

Figura 1. Correlación gráfica entre la concentración de TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  en plasma y humor acuoso estratificado por edema macular.



**Tabla 3.** Correlación entre la concentración de TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  en plasma y humor acuoso estratificado por edema macular.

Citocina	$\rho$ (95%CI)	P
TGF- $\beta_1$		
Edema macular	-0.33 (-0.63, 0.06)	<b>0.0972</b>
Control	0.01 (-0.37, 0.39)	0.9443
TGF- $\beta_2$		
Edema macular	-0.00 (-0.38, 0.38)	0.9949
Control	-0.28 (-0.11, -0.60)	0.1519

Notas al pie de tabla (Tabla 3):

$\rho$  (95%CI): Coeficiente de correlación de Pearson y su significancia estadística (P)

Al ajustar nuestros resultados mostrados en la Tabla 2 mediante una regresión lineal multivariada, la concentración en humor acuoso de TGF- $\beta_1$  continúa siendo significativamente mayor en los casos con respecto a los controles con una diferencia promedio de 434.6 ( $\pm 151.6$  DE) ( $p = 0.007$ ). Los niveles de TGF- $\beta_2$  en humor acuso tras considerar las variables listadas en la Tabla 4 pierden significancia ( $p = 0.4240$ ).

**Tabla 4.** Asociación entre la concentración en humor acuoso de TGF- $\beta_{1-2}$  y parámetros clínicos.

Regresor	Bivariado		Ajustado*	
	$\beta$ (SE)	p	$\beta$ (SE)	p
<b>TGF-<math>\beta_1</math> Humor <sup>t,a</sup> ~</b>	4181.03 (61.08)	<b>&lt;0.0001</b>	4577.00 (441.10)	<b>&lt;0.0001</b>
TGF- $\beta_1$ Sérico	-0.01 (0.01)	<b>0.0191</b>	-0.01 (0.00)	0.1422
Edema macular	440.51 (106.86)	<b>0.0001</b>	434.60 (151.60)	<b>0.0065</b>
Edad (Años)	-0.35 (3.97)	0.9305	-1.01 (3.80)	0.7923
Hombres vs. Mujeres	132.46 (123.80)	0.2900	98.35 (120.90)	0.4206
Años con diabetes	4.17 (8.45)	0.6240	-5.93 (9.52)	0.6256
Años con hipertensión	-14.08 (9.66)	0.1510	1.35 (1.12)	0.9041
Grosor macular promedio ( $\mu\text{m}$ )	1.24 (0.69)	0.0774	-3.90 (0.79)	0.4685
<b>TGF-<math>\beta_2</math> Humor <sup>t,b</sup> ~</b>	1462.40 (23.60)	<b>&lt;0.0001</b>	1536.28 (197.65)	<b>&lt;0.0001</b>
TGF- $\beta_1$ Sérico	-0.12 (0.17)	0.4970	-0.25 (0.18)	0.1720
Edema macular	110.08 (45.11)	<b>0.0182</b>	52.57 (65.10)	0.4240
Edad (Años)	0.01 (1.58)	0.9950	-0.16 (1.64)	0.9220
Hombres vs. Mujeres	10.58 (48.34)	0.8280	-4.08 (52.06)	0.9380
Años con diabetes	4.44 (3.21)	0.1730	5.20 (4.29)	0.2320
Años con hipertensión	-4.31 (3.76)	0.2580	-5.24 (4.87)	0.2880

Grosor macular promedio ( $\mu\text{m}$ )	0.49 (0.26)	0.0685	0.34 (0.35)	0.9220
---	-------------	--------	-------------	--------

---

Notas al pie de tabla (Tabla 4):

$\rho$  (95%CI): Coeficiente de correlación de Pearson y su significancia estadística (P)

\* Resultados de un análisis de regresión lineal multivariado y ajustado por todas las características clínicas listadas.

† Intercept o nivel promedio de la citocina.

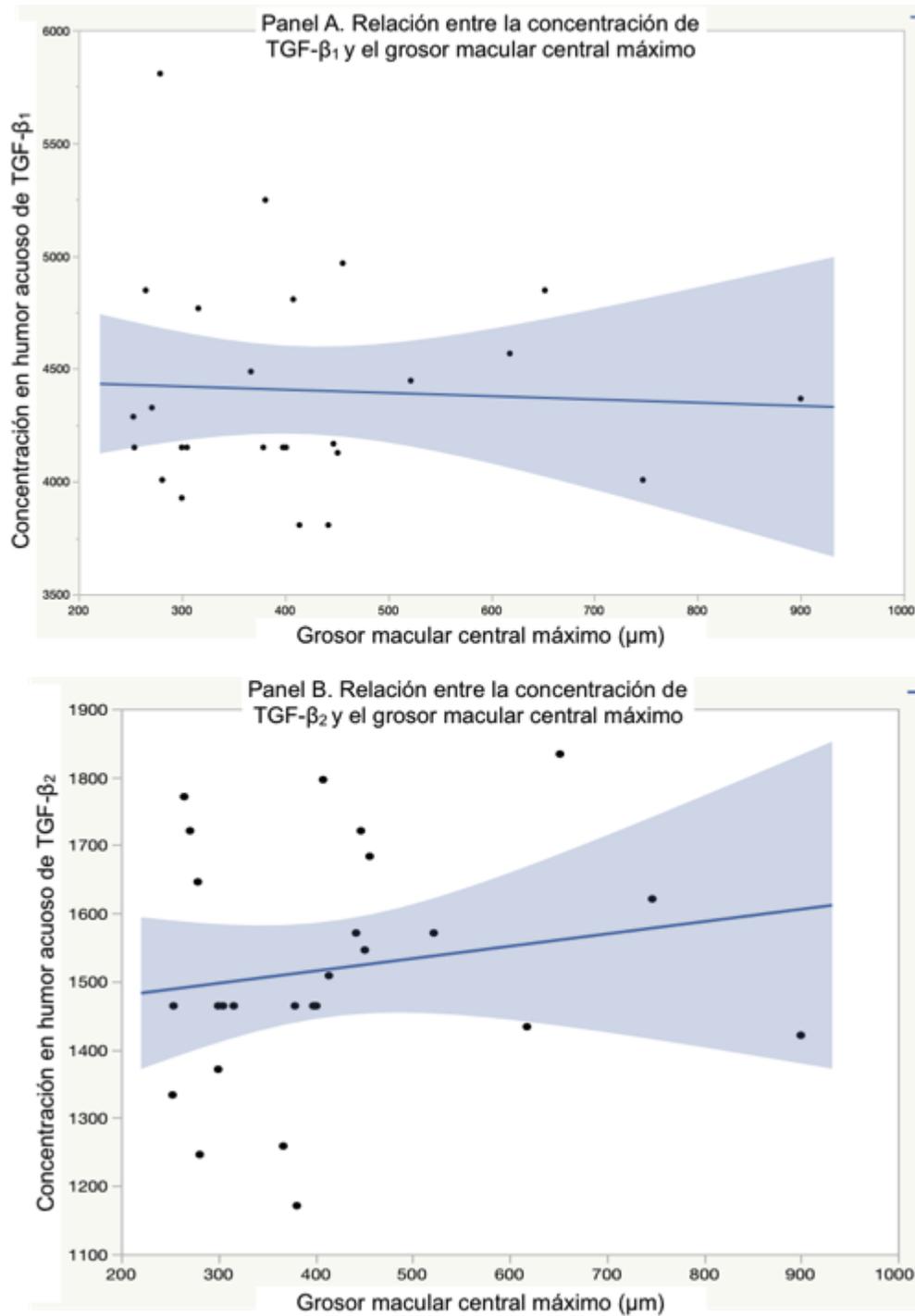
a  $R^2$  Ajustada (Porcentaje de variabilidad en el fenómeno explicado por el modelo): 0.20 , P  
0.0300

b  $R^2$  Ajustada (Porcentaje de variabilidad en el fenómeno explicado por el modelo): 0.01, P  
0.4878

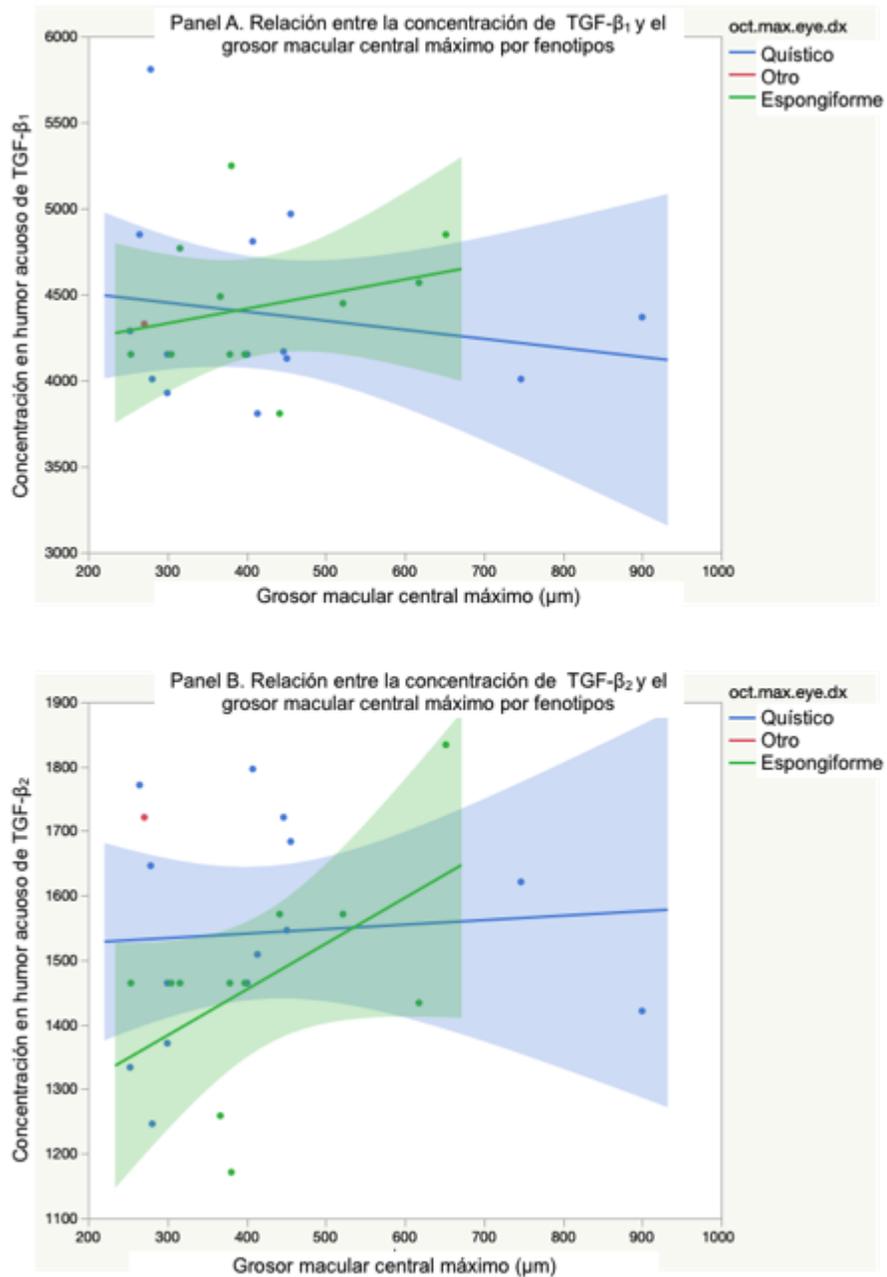
## **CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE TGFB 1 Y 2 EN SUERO Y HUMOR ACUOSO CON RESPECTO AL GROSOR MACULAR CENTRAL.**

A pesar de que los niveles de TGF- $\beta_1$  son significativamente mayores en el grupo con edema macular, al realizar la correlación entre el grosor macular central y los niveles de expresión en humor acuoso no encontramos una relación proporcional **(Figura 2)**. Aún más, al estratificar por subtipo de edema macular (espongiforme, quístico, y otros) sigue sin guardarse una relación lineal entre estas variables. **(Figura 3)**.

**Figura 2.** Relación lineal entre el grosor macular ( $\mu\text{m}$ ) y la expresión de TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  en pacientes con edema macular (n = 26)



**Figura 3.** Relación lineal entre el grosor macular ( $\mu\text{m}$ ) y la expresión de TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  en pacientes con edema macular estratificado por subtipos (n = 26)



## DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio fue el análisis sistemático de los niveles séricos y en humor acuoso de TGF- $\beta_1$  y - $\beta_2$  en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa con y sin edema macular. Posterior al análisis multivariado, encontramos que los pacientes con edema macular tienen un aumento significativo en expresión de TGF- $\beta_1$  tanto en plasma como humor acuoso con respecto a los pacientes sin edema macular. Sin embargo, este efecto no es así para los niveles de TGF- $\beta_2$ , que perdieron significancia estadística posterior al análisis.

Actualmente existen diversas líneas de investigación centradas en la fisiopatología del edema macular diabético (EMD). El EMD es un problema multifactorial en el que intervienen diversos factores derivados de hiperglicemia sérica crónica. Las alteraciones crónicas en el metabolismo fisiológico derivan en daño oxidativo, inflamación y disfunción vascular.<sup>8,9,10</sup> Entre los mecanismos más estudiados de la fisiopatología del edema macular, la isquemia tisular promueve la regulación al alza de diversas moléculas proinflamatorias como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucinas 1 y 6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) entre otras. Todas estas moléculas proinflamatorias favorecen el edema extracelular vasogénico.<sup>15</sup>

La terapéutica actual para el control del edema macular diabético está centrada en la inhibición del VEGF, el blanco terapéutico de las terapias antiangiogénicas. El advenimiento de este tipo de tratamientos moleculares dirigidos, nos ha permitido

modificar la historia natural del edema macular diabético y mejorar el pronóstico visual en esta población.<sup>22</sup> Sin embargo, en la cadena fisiopatológica del edema macular, la isquemia y la regulación a la alta de VEGF es un proceso característico de una fase muy avanzada, con cambios crónicos e irreversibles. Es por esto que es necesario estudiar nuevas rutas metabólicas y blancos terapéuticos que sean expresadas en etapas tempranas y donde el daño retiniano sea probablemente reversible.

El daño celular condicionado por la diabetes, genera disfunción vascular y pérdida de pericitos lo que deriva en disregulación del flujo capilar retiniano y subsecuente extravasación de plasma al espacio intercelular. Este mecanismo de daño ocurre previo a la isquemia.<sup>7,8</sup> En estudios in vitro de modelos de edema macular diabético (caracterizados por una pérdida celular de al menos 50% de la población total)<sup>15</sup> algunas citocinas guardan proporcionalidad con la destrucción pericitaria. Entre las citocinas más estudiadas está el TGF- $\beta$ . Betts-Obregon y colaboradores, demostraron en cultivos de pericitos humanos, que el aumento de la expresión de TGF- $\beta$ 1 genera un aumento de la apoptosis de los mismos. Esto podría ser secundario a una regulación al alta del gen *TGF $\beta$ 1* que codifica para la proteína inducida por TGF- $\beta$ , de la clona humana gen 2 (*BIG3*) que es una molécula pro-apoptótica.<sup>17</sup> Estos efectos in vitro de muerte celular, son inhibidos al añadir un anticuerpo monoclonal contra BIG3 al medio.<sup>13</sup>

Actualmente no existen estudios que valoren los efectos de TGF- $\beta$ 1 y - $\beta$ 2 en pericitos vasculares retinianos in vivo. Nuestro estudio es la primera exploración de este

fenómeno. Nuestra hipótesis fue que TGF- $\beta_1$  Y - $\beta_2$  son predictores independientes y estadísticamente significativos del edema macular diabético en la población con retinopatía diabética no proliferativa. Consideramos que era plausible que los pacientes que presentaran un descontrol sistémico mayor tuvieran más prevalencia de edema macular y mayores niveles de estas citocinas tanto en plasma como en humor acuoso.

Nuestros resultados apoyan estas hipótesis. En los análisis multivariados no encontramos diferencias significativas entre los niveles sistémicos de hemoglobina glucosilada en ambos grupos lo que sugiere que el control sistémico no es necesariamente la causa del daño presentado a nivel local. El único factor correlacionado con la presencia de edema macular fue el tiempo de evolución de la diabetes lo que es congruente con los reportes previos de edema macular.<sup>4,5,6</sup>

Consideramos que la importancia del TGF- $\beta_1$  en el daño vascular pericítico puede ser fundamental en la fisiopatogenia del edema macular temprano. Nuestro estudio es el primer paso para abrir una línea de investigación sobre este hallazgo. Dentro de las limitaciones de nuestro estudio están el tamaño muestral y el muestreo por conveniencia. Además de la necesidad de realizar imputación de algunos datos de expresión de TGF- $\beta_1$  y - $\beta_2$ , sin embargo, nuestros resultados y aproximación estadística soportan que los efectos observados en TGF- $\beta_1$  y - $\beta_2$  son clínicamente relevantes. Es de suma importancia ampliar la cantidad de pacientes y estudiar este efecto en otras poblaciones fuera de la mexicana. Nos planteamos a posterior, el estudio de la expresión de *BIGH3* en las muestras de nuestros pacientes para

soportar las hipótesis aquí planteadas de una sobreregulación de vías pro-apoptóticas medidas por estas citocinas.

## REFERENCIAS

- 1 - Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados nacionales. 2a. ed. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2013.
- 2 - ADA. National Diabetes Statistics Report, 2014. 2014. <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/>. Accessed October 2, 2014.
- 3 - Saaddine JB, Honeycutt AA, Narayan KM, et al. Projection of diabetic retinopathy and other major eye diseases among people with diabetes mellitus: United States, 2005-2050. *Arch Ophthalmol* 2008;126(12):1740–7.
- 4 - Sheila K. West, Ronald Klein, Jorge Rodriguez, Beatriz Muñoz, Aimee T. Broman, Rosario Sanchez, Robert Snyder. Diabetes and Diabetic Retinopathy in a Mexican-American Population. *Diabetes Care* Jul 2001, 24 (7) 1204-1209.
- 5 - Varma R, Choudhury F, Klein R, Chung J, Torres M, Azen SP; Los Angeles Latino Eye Study Group. Four-Year Incidence and Progression of Diabetic Retinopathy and Macular Edema: The Los Angeles Latino Eye Study. *American Journal of Ophthalmology* , Volume 149 , Issue 5 , 752 - 761.e1-3.
- 6 - Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977.

7 - Pfister F, Feng Y, vom Hagen F, Hoffmann S, Molema G, Hillebrands JL et al. Pericyte migration: a novel mechanism of pericyte loss in experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 2008; 57(9): 2495–2502.

8 - Arup Das, Paul G. McGuire, Sampathkumar Rangasamy, Diabetic Macular Edema: Pathophysiology and Novel Therapeutic Targets. *Ophthalmology*, Volume 122, Issue 7, 1375 - 1394.

9 - Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615–25.

10 - Rangasamy S, Srinivasan R, McGuire PG, Das A. Diabetic macular edema: molecular mechanisms. In: Das A, Friberg T, eds. *Therapy for Ocular Angiogenesis*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2011:88–99.

11 - Das A, Frank RN, Zhang NL, et al. Increases in collagen type IV and laminin in galactose-induced retinal capillary basement membrane thickening and prevention by an aldose reductase inhibitor. *Exp Eye Res* 1990;50:269–80.

12- Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Pareja-Rios A, et al. Diabetic macular edema pathophysiology: vasogenic versus inflammatory. *J Diabetes Res*. 2016;2016:2156273.

13 - Kuwabara T, Cogan DG. Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. *Arch Ophthalmol* 1963;69: 492–502.

14 - I. Klaassen, C. J. F. Van Noorden, and R. O. Schlingemann, “Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and

other pathological conditions,” *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 34, pp. 19– 48, 2013.

15 - Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N et al. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J* 2002; 21(16): 4307–4316.

16 - Vidro EK, Gee S, Unda R, Ma JX, Tsin A. Glucose and TGF- $\beta$ 2 modulate the viability of cultured human retinal pericytes and their VEGF release. *Curr Eye Res*. 2008 Nov;33(11) 984-93.

17 - BS Betts-Obregon, AA Mondragon, AS Mendiola, RG LeBaron, R Asmis, T Zou, F Gonzalez-Fernandez and AT Tsin. TGF $\beta$  induces BIGH3 expression and human retinal pericyte apoptosis: a novel pathway of diabetic retinopathy. *Eye* (2016) 30, 1639–1647.

18 - Mondragon AA, Betts-Obregon BS, Moritz RJ, Parvathaneni K, Navarro MM, Kim HS, Lee CF, LeBaron RG, Asmis R, Tsin AT. BIGH3 protein and macrophages in retinal endothelial cell apoptosis. *Apoptosis*. 2015 Jan;20(1):29-37. doi: 10.1007/s10495-014-1052-6.

19 - Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS Report No. 1. *Arch Ophthalmol* 1985;10:1796–806

20 - Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity of scales. *Ophthalmology* 2003;110: 1677–82.

21 - Browning DJ, Glassman AR, Aiello LP, et al. Optical coherence tomography measurements and analysis methods in optical coherence tomography studies of diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2008;115:1366–71.

22 - Relhan, N., & Flynn, H. W. (2017). The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study historical review and relevance to today's management of diabetic macular edema. *Current Opinion in Ophthalmology*, 28(3), 205–212. doi:10.1097/icu.0000000000000362

## **ABREVIATURAS**

DM – Diabetes mellitus tipo II

EMD – Edema macular diabético

HA – Hipertensión arterial

HbA1C – % de hemoglobina A1C

RDNP – Retinopatía diabética no proliferativa

TGF- $\beta_1$ – Transforming growth factor 1

TGF- $\beta_2$ – Transforming growth factor 2