



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN
DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
FUNDACIÓN DE ASISTENCIA PRIVADA
CONDE DE VALENCIANA, I.A.P.®**

**NIVELES DE BIOMARCADORES EN HUMOR VÍTREO EN
EDEMA MACULAR DIABÉTICO SIN RETINOPATÍA
DIABÉTICA PROLIFERATIVA**

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIDAD EN OFTALMOLOGÍA**

QUE PRESENTA

ALAN CHEW BONILLA

DIRECTOR DE TESIS

YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA

**CIUDAD DE MÉXICO
AGOSTO 2022**





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.

1. TITULO	3
2. INVESTIGADORES	3
3. RESUMEN ESTRUCTURADO	3
4. INTRODUCCIÓN	4
RETINOPATÍA DIABÉTICA	4
EDEMA MACULAR DIABÉTICO.....	4
TRATAMIENTO EDEMA MACULAR DIABÉTICO.....	5
BIOMARCADORES EN HUMOR VÍTREO.....	5
ROL DE LA VITRECTOMÍA EN EL EDEMA MACULAR DIABÉTICO.....	7
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
6. JUSTIFICACIÓN	9
7. OBJETIVO GENERAL	9
8. DISEÑO DEL ESTUDIO	9
9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
10. VARIABLES DE ESTUDIO.....	11
11. RESULTADOS	12
12.DISCUSIÓN	13
13. CONCLUSIÓN	14
14. ASPECTOS ÉTICOS	14
15. ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD	14
16. FINANCIAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	15
17. DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES DE LOS INVESTIGADORES	15
18. REFERENCIAS.....	15
19. ANEXOS	19

1.- Título.

Niveles de biomarcadores en humor vítreo de pacientes con edema macular diabético sin retinopatía diabética proliferativa.

2. Investigador responsable, investigadores asociados o participantes y Departamentos y/o instituciones participantes

Investigador. Dr. Alan Chew Bonilla³

Investigador. Dr. Antonio López Bolaños¹

Investigador. Dr. Federico Graue Wiechers¹

Investigador. Dr. Roberto Loaeza Castrejón¹

Investigador. Dra. Fátima Sofía Magaña Guerrero²

Investigador. Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra²

1. Departamento de Retina y Vítreo Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana IAP”
2. Departamento de Biología molecular Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana IAP”
3. Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana IAP”

3.- Resumen estructurado

Antecedentes: Aproximadamente 6.4 millones de adultos o 9.17% de la población tiene DM en México. El EMD afecta aproximadamente al 16% de los diabéticos en México. Diversos factores contribuyen a la patogénesis del EMD incluyendo hipoxia, estrés oxidativo, desequilibrio del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), alteración de la barrera hematorretiniana, leucostasis en la vasculatura retiniana, pérdida de pericitos y permeabilidad vascular aumentada. El tratamiento del EMD incluye control metabólico, administración intravítrea de anti-VEGF, implante de dexametasona intravítrea y láser focal. Existen pocos estudios donde se analizan los biomarcadores presentes en el HV de pacientes con EMD sin retinopatía diabética proliferativa, por lo tanto, el estudio de estas moléculas es de alto valor para un mejor entendimiento de la enfermedad y desarrollo de nuevas opciones terapéuticas.

Justificación. La RD tiene un espectro muy amplio de manifestaciones oculares, que van desde la presencia de microaneurismas hasta el desprendimiento de retina traccional. En términos generales la RDP se caracteriza por el desarrollo de neovasos a causa de hipoxia tisular, mientras que el EMD por la presencia de líquido en diferentes capas de la retina secundario a alteraciones en la permeabilidad vascular. Se necesita un mejor entendimiento de la fisiopatología del EMD para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Por lo tanto es de gran utilidad conocer los BM en HV de pacientes con EMD sin RDP y sin tratamiento previo ya que la base de la fisiopatología en el EMD y la RDP es distinta.

Por último no existe ningún estudio que evalúe BM en HV en población mexicana ni latina. Esto es de gran impacto ya que el comportamiento de las enfermedades no sigue el mismo patrón en diferentes poblaciones.

Objetivo General. Determinar los niveles de biomarcadores en humor vítreo de pacientes con edema macular diabético sin retinopatía diabética proliferativa, los cuales no han recibido tratamiento antiangiogénico.

Material y Métodos. Se tomarán muestras de vítreo no diluido de la cavidad vítrea central. Las muestras de vítreo serán recolectadas en tubos estériles de polipropileno, posteriormente serán almacenados a -80 °C. Se medirá la concentración de BM* en el HV utilizando el método de ELISA. El HV se cultivará al siguiente día posterior a su realización, en los medios de cultivo agar chocolate, agar sangre y agar Sabourod.

Análisis de resultados. En la estadística descriptiva se reportan medidas de tendencia central y dispersión como mediana y rango intercuartílico. Para la estadística inferencial se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para valorar la distribución de la muestra. Para comparar variables cuantitativas entre grupos independientes se realizó la prueba de U-Mann Whitney. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 25(IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp). Se considero estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

4. Introducción

Retinopatía diabética

La federación internacional de diabetes mellitus estima que la población mundial con diabetes mellitus (DM) en el 2019 fue de 463 millones y se proyecta que para el año 2045 serán 700 millones de personas las que padezcan DM. [1] La retinopatía diabética (RD) es la principal complicación de la DM y una de las principales causas de ceguera prevenible en adultos. [2,3] El edema macular diabético (EMD) es la causa más frecuente de pérdida de visión moderada en DM.[4] La clasificación de *Airlie House* se usa actualmente para estadificar la RD. [5]

Diversos mecanismos están implicados clásicamente en el desarrollo de RD, tales como permeabilidad vascular alterada y flujo retiniano anormal, engrosamiento de la membrana basal, pérdida de pericitos y formación de capilares acelulares. [6, 7, 8]

En los últimos años se han descrito otros mecanismos involucrados en el desarrollo de la RD como interacción anormal de la retina neuro-vascular, alteraciones en la señalización de la norrina, del sistema cinina-kalickreína, involucro de citocinas como TNF- α , IL-1- β , IL-6, IL-8, CCL2, factor similar a la angiopoyetina 4 (ANGPTL4, por sus siglas en inglés), y leucina rica en-alfa 2-glucoproteína 1 (LRG1). [9-14]

Edema macular diabético

Aproximadamente 6.4 millones de adultos o 9.17% de la población tiene DM en México. [15] El EMD afecta aproximadamente al 16% de los diabéticos en México. [16] La prevalencia del EMD tiene una relación directamente proporcional con la duración de la DM y el grado de RD. [17] Algunos de los factores de riesgo asociados para desarrollar EMD son los niveles séricos de glucosa, lípidos, triglicéridos, hipertensión, nefropatía diabética y embarazo [17]

El EMD clínicamente significativo se define como engrosamiento retiniano dentro de las 500 micras centrales de la mácula, el cual se caracteriza por la acumulación anormal de líquido en los espacios subretiniano y/o intrarretiniano en la región macular, lo cual tiene como consecuencia alteraciones visuales. [18, 19] Diferentes tecnologías de imagen multimodal han optimizado el estudio del EMD como la tomografía de coherencia óptica (OCT, por sus siglas en inglés), la cual proporciona un análisis microestructural y longitudinal de la mácula. [19] Diversos factores contribuyen a la patogénesis del EMD incluyendo hipoxia, estrés oxidativo, desequilibrio del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), alteración de la barrera hematoretiniana, leucostasis en la vasculatura retiniana, pérdida de pericitos y permeabilidad vascular aumentada. [20]

Tratamiento edema macular diabético

El tratamiento del EMD incluye control metabólico, administración intravítrea de anti-VEGF, implante de dexametasona intravítrea y láser focal. [21,22] El tratamiento del EMD ha cambiado en los últimos años. En la actualidad el estándar de tratamiento son las inyecciones intravítreas (IV) de anti-factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés) . Actualmente se encuentran tres fármacos disponibles: bevacizumab, ranibizumab y aflibercept.

Respecto al implante de dexametasona de lenta liberación (Ozurdex), este cuenta con múltiples ensayos clínicos que han demostrado eficacia funcional y anatómica. [23] Existen fármacos en desarrollo como inhibidores de VE-PTP, inhibidores de kaliceína, antagonistas de integrina, inhibidores de VAP-1. [24-27] Así mismo, se están llevando a cabo líneas de investigación para estudiar la eficacia terapéutica bloqueando otros BM como IL-6, la vía de la RHO cinasa y esquilamina e integrinas. [26, 27, 28]

Biomarcadores en humor vítreo

Múltiples moléculas en humor vítreo (HV) se asocian con la patogénesis del EMD. [29] La identificación de biomarcadores (BM) específicos en HV tiene distintos beneficios entre los cuales está el entendimiento de la fisiopatología, así como el poder identificar pacientes con un riesgo más alto de tener alteraciones visuales y el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas a futuro. [30]

A lo largo del tiempo se han medido los niveles de BM en HV de pacientes con EMD como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), interleucina-(IL) 6 (IL-6), IL-8, IL-2, IL-10, proteína quimio-atrayente de monocitos-1 (MCP-1, por sus siglas en inglés o CCL2), fracción soluble de la molécula de adhesión intercelular-1 (sICAM-1, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés), factor transformante de crecimiento-b (TGF-b, por sus siglas en inglés), factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, por sus siglas en inglés), eritropoyetina (EPO), procalcitonina, fibrinógeno y ferritina. [31-35] De los marcadores previamente listados no todos han demostrado tener un valor significativo en la patología del EMD, a continuación se citan algunos de los BM que participan en la fisiopatología del EMD que cuentan con evidencia científica.

Se ha demostrado que el VEGF está incrementado en pacientes con EMD. [36] Este BM participa en la permeabilidad vascular, vasodilatación, angiogénesis, y quimiotaxis de macrófagos y monocitos. La IL-6, tiene dentro de sus actividades la de ser una molécula proinflamatoria, participa en la proliferación de linfocitos B y en la migración de neutrófilos. [37] La IL-8 igualmente se encuentra aumentada en el humor acuoso de este grupo de pacientes y tiene funciones variadas como angiogénesis, fagocitosis y quimiotaxis de granulocitos. [38,39]

La antes llamada MCP-1 o CCL2 (Ligando de quimiocinas 2) participa en la migración de monocitos, células dendríticas, linfocitos *natural killer* (NK) y por lo tanto es una interleucina proinflamatoria descrita en la etiopatogenia del EMD. [40]

El sICAM-1 causa adhesión y migración leucocitaria a través del endotelio, además de tener una función promotora de la angiogénesis. [41] El TGF- β , tiene actividad en el crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis celular. En contraste con las otras citocinas, el PEDF es un inhibidor de la angiogénesis; se encuentra en condiciones normales en el HV y disminuye en situaciones de hipoxia. [31] Un metanálisis publicado en 2021 demostró que la IL-6, IL-8, MCP-1, sICAM-1, TGF- β , y el VEGF, tienen diferencias estadísticamente significativas en pacientes con edema macular diabético con respecto a población sana. [30] Lo que sugiere que la patogenia de la enfermedad es mucho más compleja de lo que se creía.

Existen pocos estudios donde se analizan los biomarcadores presentes en el HV de pacientes con EMD sin retinopatía diabética proliferativa (RDP), por lo tanto, el estudio de estas moléculas es de alto valor para un mejor entendimiento de la enfermedad.

La angiogenina es un factor pro-angiogénico, los niveles séricos de esta molécula se han reportado elevados en comparación con los niveles en humor vítreo de pacientes diabéticos con y sin retinopatía, lo cual sugiere que hay un imbalance entre la angiogenina y el VEGF. Los niveles en vítreo reportados de esta molécula apuntan a que no es responsable de la neovascularización en la retinopatía diabética. [42]

El factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) ha demostrado ser un estimulador de la angiogénesis, proliferación y migración celular. Respecto a la retinopatía diabética no se conoce claramente cual es su papel, pero estudios recientes apuntan a que la reducción del VEGF-A estimula la expresión del EGF, y esto hace una retroalimentación positiva para la producción de VEGF, contribuyendo a la angiogénesis. Teniendo en cuenta lo anterior se podría pensar en una terapia combinada contra el VEGF y el EGF para promover un control más efectivo y duradero contra la neovascularización en la retina. [43]

El péptido epitelial activador de neutrófilos 78 es un biomarcador soluble que regula el factor activador de linfocitos T (RANTES) y de la interleucina 8, los cuales se encuentran elevados en pacientes con retinopatía diabética. [44] Por otro lado el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF por sus siglas en inglés). se ha encontrado elevado en pacientes con retinopatía diabética proliferativa a pesar de tratamiento intra vítreo anti angiogénico, el cual tiene una relación directamente proporcional con el grado de fibrosis después del tratamiento intravítreo. Lo cual sugiere que la fibrosis se puede deber al bFGF. [45]

El interferón gamma (IFN-gamma por sus siglas en inglés) está implicado en la patogénesis de la retinopatía diabética modulando la polarización de macrófagos, además de inducir elevación de la interleucina 2 la cual puede mediar e inhibir la neovascularización patológica a partir de mediadores como CXCL10 y CXCL9. Por otro lado está involucrado en la reparación microglial en el daño de la microvasculatura. [46] El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (por sus siglas en inglés GF-I) actúa en la retina como un potente pro angiogénico el cual se ha descrito elevado en los pacientes con degeneración macular exudativa.

En modelos experimentales el IGF-1 disminuye la apoptosis de los fotorreceptores. Además es importante mencionar que es un modulador de la polarización en la microglia en la retina. [47]

Por otro lado la leptina es un factor pro angiogénico, se han descrito niveles aumentados en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa, aunque la información no es concluyente ya que

también se ha reportado que no hay una diferencia significativa respecto a los niveles entre pacientes con retinopatía diabética proliferativa y controles. [48]

Es importante mencionar que el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB por sus siglas en ingles) se ha encontrado elevado de forma consistente en humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética, al cual se le atribuye ser un causante primario de la neovascularización. Esto ha sido demostrado en estudios in-vitro e in-vivo, sugiriendo una combinación sinérgica con el VEGF.

Tomando en cuenta lo previo este puede ser un objetivo terapéutico en el futuro para la retinopatía diabética proliferativa. [49] Los niveles de el factor de crecimiento plaquetario (PIGF por sus siglas en ingles) se asocian de forma positiva con la retinopatía diabética proliferativa de forma significativa si se compara con la retinopatía diabética no proliferativa, con una relación directamente proporcional. También se ha propuesto como un marcador para monitorizar la efectividad terapéutica. [50]

Finalmente las metaloproteinasas de matriz extracelular (TIMP por sus siglas en ingles) tienen un balance en condiciones fisiológicas, el cual se encuentra en disrupción en la retinopatía diabética. Tienen un rol en la permeabilidad vascular ya que degradan proteínas de unión como ocludinas y caderinas las cuales son de suma importancia para mantener la barrera hematorretiniana externa. Se han demostrado niveles elevados en humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa. También se ha encontrado una relación estrecha con el VEGF. [51]

La Trombopoyetina es una citocina que participa en la producción plaquetaria aunado a esto la diabetes mellitus se considera un estado pro trombótico. Esta molécula participa en la proliferación y diferenciación de los progenitores megacariocitos. Se ha reportado una disminución de plaquetas en pacientes a los que se les administra anticuerpos contra THPO. Este es un marcador de importancia ya que en la retinopatía diabética se encuentra una reactividad plaquetaria aumentada. [52]

Rol de la vitrectomía en el edema macular diabético

Estudios como el DRCR Network, protocolo D, han evidenciado mejoría en la agudeza visual de los pacientes (38% mejoraron 10 letras o más), aunado a la disminución en grosor macular central (reducción media de 200µm). Ahora bien, en los pacientes diabéticos se ha evidenciado un aumento de grosor a nivel de la membrana limitante interna, que podría contribuir con tracción tangencial en los pacientes con edema macular diabético. Más aún se ha demostrado que las altas concentraciones de colágeno, laminina y fibronectina, no solo aumenta el grosor de la membrana limitante interna, sino que también pueden producir un efecto tóxico a nivel de la retina neurosensorial. [53]

Con respecto al tema existen pequeñas series de casos en la literatura que evalúan la vitrectomía pars plana, con remoción de la membrana limitante interna, y en las series existentes se ha comparado el manejo quirúrgico frente a la aplicación de láser. En dichas series se ha encontrado una mejoría en el grosor retiniano, no obstante la mejoría en la agudeza visual no ha sido notoria. [54] Los estudios realizados hasta el momento para el medicamento Aflibercept, no han mostrado inferioridad con respecto a el Ranibizumab y el Bevacizumab, por el contrario ha mostrado con una menor cantidad de dosis una respuesta similar a la obtenida con los anteriores y en estudios

recientes como el protocolo T del DRCR Network, se evidenció que en paciente con agudezas visuales peores de 20/ 40 tenía una mejor respuesta. [53]

Teniendo en cuenta las descripciones anteriores, podemos ver que existen amplias descripciones acerca del manejo del componente vascular, inflamatorio mediado por el VEGF en pacientes con edema macular diabético, no obstante, la interfaz Vitreoretiniana ha sido descrita como un factor que podría generar edema macular diabético, sobre todo en aquellas personas que tienen alteraciones a nivel de ésta, como tracciones vitreomaculares persistentes, vítreo cortical persistente después de un desprendimiento posterior del vítreo, hialoides posterior engrosada y muy adherida con o sin adherencias a la membrana limitante interna o loculaciones de citoquinas en la bolsa vítrea pre-macular . [55, 56]

Existen reportes en la literatura donde se describen resoluciones espontáneas del edema macular diabético, posterior al desprendimiento posterior del vítreo, esto coincidiría con los hallazgos de Nasrallah et al, quienes encontraron que en los pacientes diabéticos con edades de 60 años o mayores y con edema macular diabético, se producía una prevalencia mayor de vítreo posterior adherido que en los pacientes sin edema macular. [57] Por otra parte la presencia de una hialoides posterior engrosada y tensa, puede producir un factor traccional extra que se asocia a la presencia de citoquinas y células pro-inflamatorias que impregnan la hialoides generando edema macular. Este hallazgo puede ser valorable tanto en la biomicroscopía, como en estudios de OCT y por alteraciones tipo filtración en la angiografía con fluoresceína. [58]

Otro factor de importancia a evaluar en los pacientes con edema macular diabético que ha venido presentando un mayor interés en los últimos años es la membrana limitante interna; ésta se encuentra en contacto directo con los podocitos de las células de Müller las cuales se extienden desde la membrana limitante interna hasta la membrana limitante externa. La remoción de ésta, ha demostrado en algunos estudios clínicos una disminución en el grosor retiniano con mejoría en la agudeza visual.

Recientemente, la sociedad vitreo-retiniana europea para el estudio de edema macular, reportó un estudio no aleatorizado, multicéntrico, en donde encontraron que el 55.2% de los pacientes a quienes se les realizó vitrectomía con remoción de la membrana limitante interna presentaron una mejoría de la agudeza visual de hasta 3 líneas en comparación con un 31,3% en los pacientes tratados con inyecciones de anti-VEGF (P= 0,0031). Cuando se valoró frente a grupos de pacientes tratado con vitrectomía más remoción de la membrana limitante interna, aplicación intravítrea de anti-VEGF y aplicación de laser en rejilla macular umbral y sub-umbral, evidenció una recuperación en la agudeza visual mayor. [59]

5. Planteamiento del problema

El EMD es la principal causa de baja visual en el paciente con DM, las opciones terapéuticas actuales tienen resultados favorables. Sin embargo existen casos donde el tratamiento no siempre es efectivo, además de ser un tratamiento costoso que en la mayoría de los casos requiere ser administrado de forma crónica. Por esta razón, es necesario el conocimiento a detalle de los BM involucrados en el EMD, lo cual aportará información de utilidad para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y un mejor entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad. Por otro lado se han descrito múltiples marcadores en el HV de pacientes con EMD, pero existe poca

información de los BM en HV de pacientes sin algún tratamiento previo y sin RDP. Tomando en cuenta lo mencionado previamente es posible que las mediciones reportadas previamente no sean lo suficientemente específicas para el EMD en particular, por lo tanto se requiere más evidencia científica de BM en pacientes exclusivamente con EMD sin RDP y sin tratamiento previo.

6. Justificación

La RD tiene un espectro muy amplio de manifestaciones oculares, que van desde la presencia de microaneurismas hasta el desprendimiento de retina traccional. En términos generales la RDP se caracteriza por el desarrollo de neovasos a causa de hipoxia tisular, mientras que el EMD por la presencia de líquido en diferentes capas de la retina secundario a alteraciones en la permeabilidad vascular.

Se necesita un mejor entendimiento de la fisiopatología del EMD para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Por lo tanto es de gran utilidad conocer los BM en HV de pacientes con EMD sin RDP y sin tratamiento previo ya que la base de la fisiopatología en el EMD y la RDP es distinta. Por último no existe ningún estudio que evalúe BM en HV en población mexicana ni latina. Esto es de gran impacto ya que el comportamiento de las enfermedades no sigue el mismo patrón en diferentes poblaciones.

La realización de vitrectomía en los pacientes con edema macular diabético se ha propuesto como una alternativa para el tratamiento de este en la actualidad, múltiples estudios lo demuestran, como se ha citado mencionado en la introducción de este texto previamente. El departamento de retina del instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP está llevando a cabo actualmente un protocolo titulado "Comparación de Vitrectomía con remoción de membrana limitante interna y terapia intravítrea con Aflibercept para el manejo de edema macular diabético no traccional" como opción de tratamiento para el EMD. Es importante recalcar que el presente protocolo, depende en su totalidad del previamente mencionado, mismo que se encuentra aprobado por los comités del instituto.

7. Objetivo General

Determinar los niveles de biomarcadores en humor vítreo de pacientes con edema macular diabético sin retinopatía diabética proliferativa, los cuales no han recibido tratamiento anti angiogénico.

8. Diseño del estudio

Transversal, analítico, observacional.

9. Material y métodos

Toma de muestra y almacenamiento

Una vez que se invite a participar al sujeto de investigación y se firme el consentimiento informado (Apéndice 1). Se tomarán muestras de 0.4 - 0.8ml de vítreo no diluido de la cavidad vítrea central usando un vitreotomo al inicio de la vitrectomía, Las muestras de vítreo serán recolectadas en tubos estériles de polipropileno, se centrifugarán a 10, 000xg por 10 minutos para separar los componentes sólidos y los líquidos, posteriormente serán almacenados a -80 °C hasta el momento en que se realice el análisis de concentraciones de BM.

Medición de biomarcadores

Se midió la concentración de BM en el HV utilizando el método de ELISA (Awareness ELISA reader 2100), a los tubos *PDAMS1, PDMAS2, PDMAS3 y PDAME3.

1. Angiogenina
2. EGF
3. ENA-78
4. bFGF
5. GRO
6. IFN-gamma
7. IGF-I
8. IL-6
9. IL-8
10. Leptina
11. MCP-1
12. PDGF-BB
13. PIGF
14. RANTES
15. TGF-beta1
16. TIMP-1
17. TIMP-2
18. Trombopoyetina
19. VEGF-A
20. VEGF-D

Seguridad de esterilidad

El HV recolectado (PDAMS1, PDMAS2, PDMAS3 y PDAME3) se envasará en un frasco. El HV se cultivará al siguiente día posterior a su realización, en los medios de cultivo agar chocolate, agar sangre y agar Sabourod.

Análisis estadístico

En la estadística descriptiva se reportan medidas de tendencia central y dispersión como mediana y rango intercuartílico. Para la estadística inferencial se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para valorar la distribución de la muestra. Para comparar variables cuantitativas entre grupos independientes se realizó la prueba de U-Mann Whitney. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp). Se considero estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Grupo de estudio

Criterios de inclusión

- Pacientes con edema macular diabético clínicamente significativo definido como:
 1. Edema retiniano que involucre las 500 micras centrales de la fóvea
 2. Exudados duros que involucren las 500 micras centrales de la fóvea con edema adyacente el cual puede estar fuera de las 500 micras centrales de la fóvea
 3. Edema retiniano de un diámetro de disco o más (1.5mm), que se encuentre dentro de las 1500 micras circundantes al centro de la fóvea
- >50 años

- Pacientes con DM-2, sin importar el tiempo e evolución
- Edema macular no traccional (cualquier patrón) en tomografía de coherencia óptica
- Agudeza visual por Snellen peor o igual a 20/80 en el ojo afectado
- Retinopatía diabética no proliferativa; leve, moderada y severa
- Retinopatía diabética no proliferativa confirmada con angiografía con fluoresceína; es decir que no tenga hiperfluorescencia compatible con fuga, que aumente en intensidad y extensión a lo largo del estudio.
- Pacientes que cuenten con HbA1c; este únicamente para conocer el control glucémico del paciente de los últimos 3 meses. No se tomará ningún nivel para incluirlos en el estudio, únicamente se solicitarán los niveles del mismo para conocer el control metabólico.

Criterios de exclusión

- Pacientes con terapia intravítrea antiangiogénica previa
- Pacientes con membrana epiretiniana
- Pacientes con síndrome de tracción vitreomacular asociado a edema macular en pacientes diabéticos
- Cualquier procedimiento quirúrgico oftalmológico previo
- Degeneración macular relacionada a la edad
- Cicatrices coriorretinianas en área macular
- Glaucoma
- Historia de hipertensión ocular
- Desprendimiento de retina
- Distrofias retinianas

10. Variables de estudio

Variable	Definición operacional	Tipo	Escala de medición
ANGIOGENINA	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
EGF	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
ENA-78	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
bFGF	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
GRO	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
IFN-gamma	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
IGF-1	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
IL-6	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
IL-8	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
LEPTINA	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
MCP-1	ELISA	Cuantitativa, continua	UA

PDGF-BB	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
PIGF	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
RANTES	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
TGF-beta1	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
TIMP-1	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
TIMP-2	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
Trombopoyetina	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
VEGF-A	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
VEGF-D	ELISA	Cuantitativa, continua	UA
UA: unidades arbitrarias			

Variables para el análisis de seguridad

Variable	Definición operacional	Tipo	Escala de medición
Esterilidad	Cultivo en agar chocolate, agar sangre y agar Sabourod	Cuantitativa, nominal	si/no

11. Resultados

Los valores obtenidos de la concentración de los biomarcadores en humor vítreo de ambos grupos se expresan en unidades arbitrarias (UA).

Las moléculas que tuvieron diferencia significativa ($p < 0.5$) entre ambos grupos fueron:

- Angiogenina ($p = .004$)
- EGF ($p = 0.003$)
- ENA-78 ($p = 0.003$)
- BFGF ($p = 0.004$)
- TIMP-1 ($p = 0.001$)
- TIMP-2 ($p = 0.004$)
- IGF-1 ($p = 0.004$)

Las moléculas que no tuvieron diferencia significativa ($p = <.05$) entre ambos grupos fueron:

- GRO
- INF-B
- IL-6
- IL-8
- LEPTINA
- MCP1
- PDGF
- PIGF
- RANTES
- TGFB
- TROMBOPOYETINA
- VEGF
- VEGF-D

Las variables con diferencia significativa, y con valores más elevados en el grupo de retinopatía diabética proliferativa fueron: Angiogenina 200 (10 - 620 UA), ENA-78 10 (-10 - 75UA), BFGF 10 (-10 a 100 UA) e IGF1 10 (-10 - 30UA). Mientras que las variables con diferencia significativa con valores más altos en el grupo de edema macular diabético sin retinopatía diabética proliferativa fueron EGF 80 000 (38000 - 177500 UA), TIMP1 75000 (45000 - 97500 UA), TIMP2 345000 (117500 - 750058 UA)

Los niveles de biomarcadores en los distintos grupos se adjuntan en el anexo 1 y 2.

12. Discusión

En este estudio analizamos las diferencias entre distintas moléculas involucradas en el espectro de la retinopatía diabética incluyendo la variante proliferativa y la no proliferativa con edema macular diabético. Dentro de las que se encontraron más elevadas en el grupo de edema macular diabético se encuentra el factor de crecimiento epidérmico (EGF) descrito previamente como un estimulador de la angiogénesis, proliferación y migración celular, asimismo se ha descrito como estimulador del VEGF-A, lo cual contribuye a la angiogénesis. En el presente estudio el VEGF no se encontró con diferencia significativa entre ambos grupos, por lo tanto es posible que el EGF se encuentre con niveles más altos en el edema macular en comparación con la retinopatía diabética proliferativa, por lo tanto es un marcador con mayor importancia en la patogénesis del edema macular diabético a diferencia de la retinopatía diabética proliferativa. [43] Se ha descrito que el EGF tiene una menor actividad proangiogénica en comparación con el factor de crecimiento de fibroblastos aunque estos actúen de forma sinérgica, incluso se ha reportado que EGF no disminuye sus niveles con la administración de antiangiogénicos. [60] Por lo tanto esto refuerza la teoría que el EGF tiene un mayor impacto en la patogénesis del edema macular diabético y no así en la forma proliferativa de la retinopatía diabética

Las metaloproteinasas de matriz extracelular (TIMP 1 y 2) igualmente se encontraron con valores más elevados en los vitreos de pacientes con edema macular. Se ha descrito que el balance de estas moléculas se altera en la retinopatía diabética. Teniendo un rol fundamental en la permeabilidad vascular degradando las ocludinas y las cadherinas, alterando la barrera hemoretiniana externa. [51] Tomando en cuenta lo mencionado previamente respecto a las funciones de las TIMP 1 y 2, es entendible que se encuentren mucho más elevadas en pacientes

con edema macular diabético ya que la alteración de la barrera hematorretiniana juega un papel primordial en el desarrollo de esta patología. Se ha descrito que sujetos con retinopatía diabética proliferativa tienen niveles elevados de esta molécula pero en el presente estudio se demuestra que tiene una mayor importancia en el edema macular diabético. [61]

13. Conclusión

El factor de crecimiento epidérmico, así como las metaloproteinasas de matriz extracelular 1 y 2 se encuentran elevados de forma predominante en los pacientes con edema macular diabético sin retinopatía diabética proliferativa. Por lo tanto el desarrollo de fármacos que actúen sobre estas moléculas puede ser un adyuvante o una terapia efectiva en el tratamiento del edema macular diabético.

14. Aspectos éticos

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación (CEI-2022/03/03). Este protocolo conlleva un riesgo mínimo. Los tejidos destinados para investigación fueron obtenidos mediante consentimiento informado de los pacientes.

15. Aspectos Bioseguridad

Los tejidos que se usaron corresponden a los fragmentos de humor vítreo destinados para investigación. Los restos de tejido que corresponden a residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) se desecharon de acuerdo con lo dispuesto en el Manual de Bioseguridad de la Unidad de Investigación (MB-SC-UINV-DM-01) que se basa en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, en resumen, la disposición de residuos dentro de las instalaciones del Instituto es:

Tipo de residuo	Estado físico	Envasado	Color
Sangre	Líquido	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos	Sólido	Bolsas de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

En el caso de los residuos CRETÍ estos se manejaron, almacenaron y desecharon de acuerdo con el Manual de identificación, almacenamiento de sustancias químicas y desecho de residuos CRETÍ de la unidad de investigación (MS-SC-UINV-DM-01) en particular siguiendo el Procedimiento para identificación y desecho de residuos peligrosos tipo CRETÍ (PR-SC-UINV-DM-02).

16. Financiamiento de la investigación

Los recursos financieros del presente protocolo dependen del protocolo titulado; **Comparación de vitrectomía con remoción de membrana limitante interna y terapia intravítrea con aflibercept para el manejo de edema macular diabético no traccional**. Ya que las muestras de vítreo que se recolectarán son de pacientes incluidos en ese protocolo, mismo que ya tiene recursos financieros aprobados por el instituto.

El cual cuenta con las siguientes claves de aprobación

- Comité de investigación (CI-009-2019)
- Comité de ética en investigación (CE-2019/06/01)
- Comité de bioseguridad (CB-009-2019)

El financiamiento del kit de los arreglos proteicos proviene de : **UNAM-DGAPA IN203821**

17. Declaración de conflicto de intereses de los investigadores

Los autores no tienen ningún interés comercial o de propiedad en ningún concepto o producto descrito en esta investigación. Los investigadores que colaboran en el presente protocolo declaran que no tienen conflicto de intereses para llevar a cabo este estudio

18. Referencias

- [1.] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843.
- [2.] Khalil H. Diabetes microvascular complications: a clinical update. *Diabetes Metab Syndr.* 2017;11(Suppl 1):S133eS139.
- [3.] Leasher JL, Bourne RR, Flaxman SR, et al. Global estimates on the number of people blind or visually impaired by diabetic retinopathy: a meta-analysis from 1990 to 2010. *Diabetes Care.* 2016;39(9):1643e1649.
- [4.] Zhang X, Saaddine JB, Chou CF, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005e2008. *JAMA.* 2010;304(6):649e656.
- [5.] Solomon, S. D. et al. Diabetic retinopathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 40, 412–418 (2017).
- [6.] Kohner, E. M., Patel, V. & Rassam, S. M. Role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 44, 603–607 (1995).
- [7.] Roy, S., Ha, J., Trudeau, K. & Beglova, E. Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr. Eye Res.* 35, 1045–1056 (2010).
- [8.] Enge, M. et al. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J.* 21, 4307–4316 (2002).
- [9.] Nguyen, T. T. et al. Correlation of light-flicker-induced retinal vasodilation and retinal vascular caliber measurements in diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 5609–5613 (2009).
- [10.] Zhou, Y. et al. Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *J. Clin. Invest.* 124, 3825–3846 (2014).
- [11.] Clermont, A. et al. Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes* 60, 1590–1598 (2011).

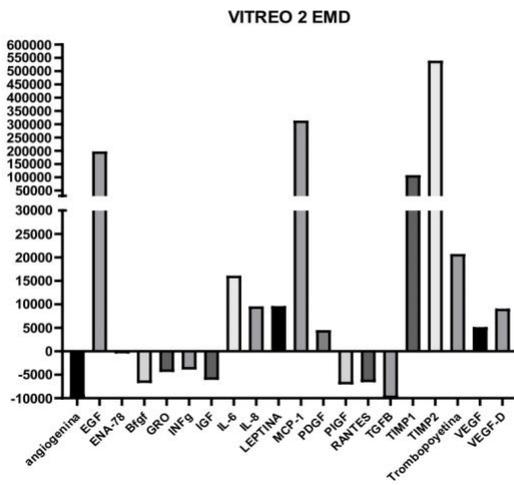
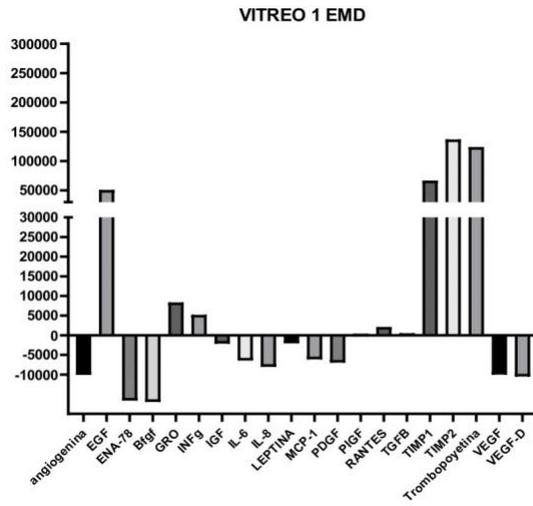
- [12.] Koleva-Georgieva, D. N., Sivkova, N. P. & Terzieva, D. Serum inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med.* 53, 44–50 (2011).
- [13.] Sodhi, A. et al. Angiopoietin-like 4 binds neuropilins and cooperates with VEGF to induce diabetic macular edema. *J. Clin. Invest.* 129, 4593–4608 (2019).
- [14.] Wang, X. et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling. *Nature* 499, 306–311 (2013).
- [15.] Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Publica Mex.* 2013;55(2):s129-36.
- [16.] Prado-Serrano, A., Guido-Jiménez, M. A., & Camas-Benitez, J. T. (2009). Prevalencia de retinopatía diabética en población mexicana. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 83(5), 261-266.
- [17.] Varma R, Bressler NM, Doan QV, Gleeson M, Danese M, Bower JK, et al. Prevalence of and risk factors for diabetic macular edema in the United States. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132:1334–50.
- [18.] Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Arch Ophthalmol* 1985; 103(12): 1796–1806.
- [19.] A. Daruich, A. Matet, A. Moulin et al., “Mechanisms of macular edema: beyond the surface,” *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 63, pp. 20–68, 2018.
- [20.] E. J. Duh, J. K. Sun, and A. W. Stitt, “Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies,” *JCI Insight*, vol. 2, no. 14, article e93751, 2017.
- [21.] Kim, E.J., Lin, W.V., Rodriguez, S.M. et al. Treatment of Diabetic Macular Edema. *Curr Diab Rep* 19, 68 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1188-4>
- [22.] Virgili G, Parravano M, Menchini F, et al. Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema. *Cochrane Db Syst Rev* 2014; 10: CD007419.
- [23.] Kodjikian L, Bellocq D and Mathis T. Pharmacological management of diabetic macular edema in real-life observational studies. *Biomed Res Int* 2018, [https://www. 8 European Journal of Ophthalmology 00\(0\)](https://www.8EuropeanJournalofOphthalmology00(0))
- [24.] Campochiaro PA, Khanani A, Singer M, et al. Enhanced benefit in diabetic macular edema from AKB-9778 Tie2 activation combined with vascular endothelial growth factor suppression. *Ophthalmology.* 2016;123:1722–1730.
- [25.] Urias EA, Urias GA, Monickaraj F, et al. Novel therapeutic targets in diabetic macular edema: beyond VEGF. *Vision Res.* October 16, 2017.[Epub ahead of print].
- [26.] Li YJ, Li XH, Wang LF, et al. Therapeutic efficacy of a novel non-peptide α v β 3 integrin antagonist for pathological retinal angiogenesis in mice. *Exp Eye Res.* 2014;129:119–126.
- [27.] Agarwal A, Afridi R, Hassan M, et al. Novel therapies in development for diabetic macular edema. *Curr Diab Rep.* 2015;15:75.
- [28.] Ung C, Borkar DS, Young LH. Current and emerging treatment for diabetic macular edema. *Int Ophthalmol Clin.* 2017;57:165–177.
- [29.] Das A, McGuire PG & Rangasamy S (2015): Diabetic macular edema: pathophysiology and novel therapeutic targets. *Ophthalmol* 122: 1375–1394.
- [30.] Minaker, S.A., Mason, R.H., Lahaie Luna, G., Farahvash, A., Garg, A., Bhabra, N., Bapat, P. and Muni, R.H. (2022), Changes in aqueous and vitreous inflammatory cytokine levels in diabetic macular oedema: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol*, 100: e53-e70. <https://doi.org/10.1111/aos.14891>
- [31.] Liu Y, Leo LF, McGregor C, Grivitchvili A, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) peptide eye drops reduce inflammation, cell death and vascular leakage in diabetic retinopathy in *Ins2 Akita* mice. *Mol Med.* 2012;18(10):1387–401.

- [32.] Podkowinski D, Orłowski-Wimmer E, Zlabinger G, et al. (2020): Aqueous humour cytokine changes during a loading phase of intravitreal ranibizumab or dexamethasone implant in diabetic macular oedema. *Acta Ophthalmol* 98: e407–e415.
- [33.] Hillier R, Ojaimi E, Wong D. AQUEOUS HUMOR CYTOKINE LEVELS AS BIOMARKERS OF DISEASE SEVERITY IN DIABETIC MACULAR EDEMA. *Retina*. 2017;37(4):761-769.
- [34.] Sun C, Zhang H, Jiang J. Angiogenic and inflammatory biomarker levels in aqueous humor and vitreous of neovascular glaucoma and proliferative diabetic retinopathy. *International Ophthalmology*. 2019;40(2):467-475.
- [35.] Kimura K, Orita T, Kobayashi Y. Concentration of acute phase factors in vitreous fluid in diabetic macular edema. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2017;61(6):479-483.
- [36.] Yenihayat F, Özkan B, Kasap M, Karabaş VL, Güzel N, Akpınar G, Pirhan D. Vitreous IL-8 and VEGF levels in diabetic macular edema with or without subretinal fluid. *Int Ophthalmol*. 2019 Apr;39(4):821-828. doi: 10.1007/s10792-018-0874-6. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29524030.
- [37.] Yi QY, Wang YY, Chen LS et al. (2020): Implication of inflammatory cytokines in the aqueous humour for management of macular diseases. *Acta Ophthalmol* 98: e309–e315.
- [38.] Kim M, Kim Y, Lee SJ (2015) Comparison of aqueous concentrations of angiogenic and inflammatory cytokines based on optical coherence tomography patterns of diabetic macular edema. *Indian J Ophthalmol* 63:312–317. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.158069>
- [39.] Teijeira A, Garasa S, Ochoa MC, Villalba M, Olivera I, Cirella A, Eguren-Santamaria I, Berraondo P, Schalper KA, de Andrea CE, Sanmamed MF, Melero I. IL8, Neutrophils, and NETs in a Collusion against Cancer Immunity and Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2021 May 1;27(9):2383-2393. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1319. Epub 2020 Dec 29. PMID: 33376096.
- [40.] Singh P, Deuchler S, Chedid A, Brui N, Kohnen T, Ackermann H & Kock FHJ (2020): The correlation between the expression of cytokines and growth factors and the clinical stage of diabetic retinopathy in patients with DME - results from the ILUVIT study, a single center, phase IV study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 61: 4879.
- [41.] Felfeli T, Juncal VR, Hillier RJ et al. (2019): Aqueous humor cytokines and long-term response to anti-vascular endothelial growth factor therapy in diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 206: 176–183.
- [42.] Marek N, Raczyńska K, Siebert J, Myśliwiec M, Zorena K, Myśliwska J, Reiwer-Gostomska M, Trzonkowski P. Decreased angiogenin concentration in vitreous and serum in proliferative diabetic retinopathy. *Microvasc Res*. 2011 Jul;82(1):1-5. doi: 10.1016/j.mvr.2011.04.006. Epub 2011 Apr 23. PMID: 21539846.
- [43.] Cabral, T., Mello, L.G.M., Lima, L.H. *et al.* Retinal and choroidal angiogenesis: a review of new targets. *Int J Retin Vitro* 3, 31 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40942-017-0084-9>
- [44.] Farris RA, Price ET. Reverse Translational Study of Fenofibrate's Observed Effects in Diabetes-Associated Retinopathy. *Clin Transl Sci*. 2017 Mar;10(2):110-116. doi: 10.1111/cts.12412. Epub 2016 Dec 20. PMID: 27996196; PMCID: PMC5352499.
- [45.] Li JK, Wei F, Jin XH, Dai YM, Cui HS, Li YM. Changes in vitreous VEGF, bFGF and fibrosis in proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab. *Int J Ophthalmol*. 2015 Dec 18;8(6):1202-6. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2015.06.22. PMID: 26682173; PMCID: PMC4651889.
- [46.] Li BY, Tan W, Zou JL, He Y, Yoshida S, Jiang B, Zhou YD. Role of interferons in diabetic retinopathy. *World J Diabetes* 2021; 12(7): 939-953

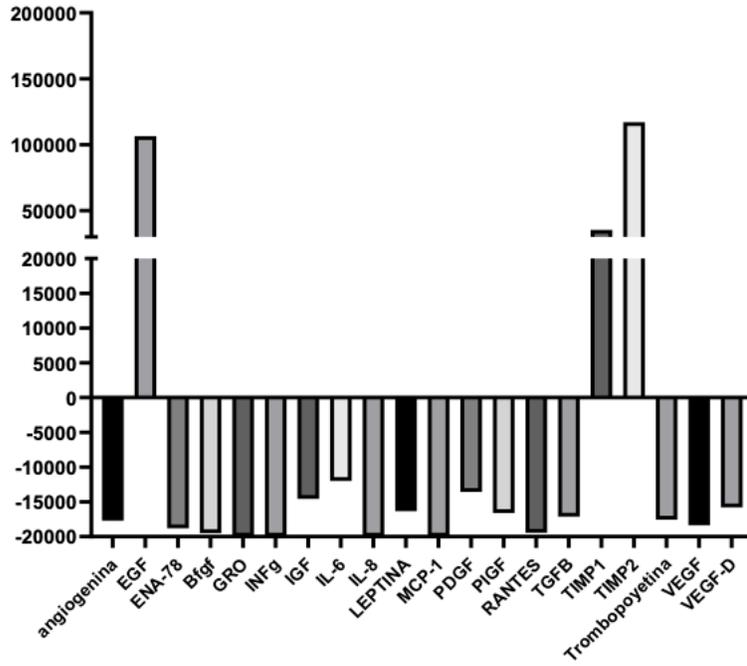
- [47.] Arroba AI, Campos-Caro A, Aguilar-Diosdado M, Valverde ÁM. IGF-1, Inflammation and Retinal Degeneration: A Close Network. *Front Aging Neurosci.* 2018 Jul 5;10:203. doi: 10.3389/fnagi.2018.00203. PMID: 30026694; PMCID: PMC6041402.
- [48.] Hernández C, Lecube A, Castellanos JM, Segura RM, Garat M, García-Arumí J, Simó R. Intravitreal leptin concentrations in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Retina.* 2004 Feb;24(1):30-5. doi: 10.1097/00006982-200402000-00005. PMID: 15076941.
- [49.] McAuley AK, Sanfilippo PG, Hewitt AW, Liang H, Lamoureux E, Wang JJ, Connell PP. Vitreous biomarkers in diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Complications.* 2014 May-Jun;28(3):419-25. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2013.09.010. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24630762.
- [50.] Deuchler S, Schubert R, Singh P, Chedid A, Brui N, Kenikstul N, et al. (2021) Vitreous expression of cytokines and growth factors in patients with diabetic retinopathy—An investigation of their expression based on clinical diabetic retinopathy grade. *PLoS ONE* 16(5): e0248439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248439>
- [51.] Drankowska, J., Kos, M., Kościuk, A., Marzęda, P., Boguszczyńska-Czubara, A., Tylus, M., & Świąch-Zubilewicz, A. (2019). MMP targeting in the battle for vision: Recent developments and future prospects in the treatment of diabetic retinopathy. *Life sciences*, 229, 149-156.
- [52.] Fukuda T, Hamaguchi M, Osaka T, Hashimoto Y, Ushigome E, Asano M, Yamazaki M, Fukuda E, Yamaguchi K, Ogawa K, Goshima N, Fukui M. A Pilot Study on the Effect of Anti-Thrombopoietin Antibody on Platelet Count in Patients with Type 2 Diabetes. *Molecules.* 2020; 25(7):1667. <https://doi.org/10.3390/molecules25071667>
- [53.] Wells J, Glassman A, Ayala A, The Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Aflibercept, bevacizumab or ranibizumab for diabetic macular edema. *New England Journal of Medicine* 2015;26:372:13:1193-203.
- [54.] Haller JA, Qin H, Apte RS, et al. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network Writing Committee; Vitrectomy outcomes in eyes with diabetic macular edema and vitreomacular traction *Ophthalmology.* 2010;117:1087-1093
- [55.] Neelakshi Bhagat, Ruben A. Grigorian, Diabetic macular edema: Pathogenesis and Treatment, *Survey of ophthalmology* volume 54 number 1 January–February 2009.
- [56.] Arup Das, Paul G. McGuire, Diabetic macular edema: pathophysiology and novel therapeutic targets, *Ophthalmology* 2015;-:1e20.
- [57.] Kohno T, Sorgente N, Goodnight R, Ryan S. Alterations in the distribution of fibronectin and laminin in the diabetic human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28:515-521
- [58.] Patel JI, Hykin PG, Schadt M, Luong V, Fitzke F, Gregor ZJ. Pars plana vitrectomy with and without peeling of the inner limiting membrane for diabetic macular edema. *Retina.* 2006;26:5-13
- [59.] Ron Adelman, Aaron Parnes, Strategy for the Management of Diabetic Macular Edema: The European Vitreo-Retinal Society Macular Edema Study, *Biomed Research International.* 2015; 2015.
- [60.] Fredj-Reygrobellet D, Baudouin C, Negre F, Caruelle JP, Gastaud P, Lapalus P. Acidic FGF and other growth factors in preretinal membranes from patients with diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 1991; 23:154-161.
- [61.] Zhang N, Ke J, Zhang D, Zhang Y, Fu Y, Cao B, Zhao D. A dynamic nomogram for predicting diabetic macular edema in type 2 diabetes patients based on plasma cytokines. *Aging (Albany NY).* 2021 Mar 3;13(6):8369-8379. doi: 10.18632/aging.202647. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33686950; PMCID: PMC8034887.

19. Anexos

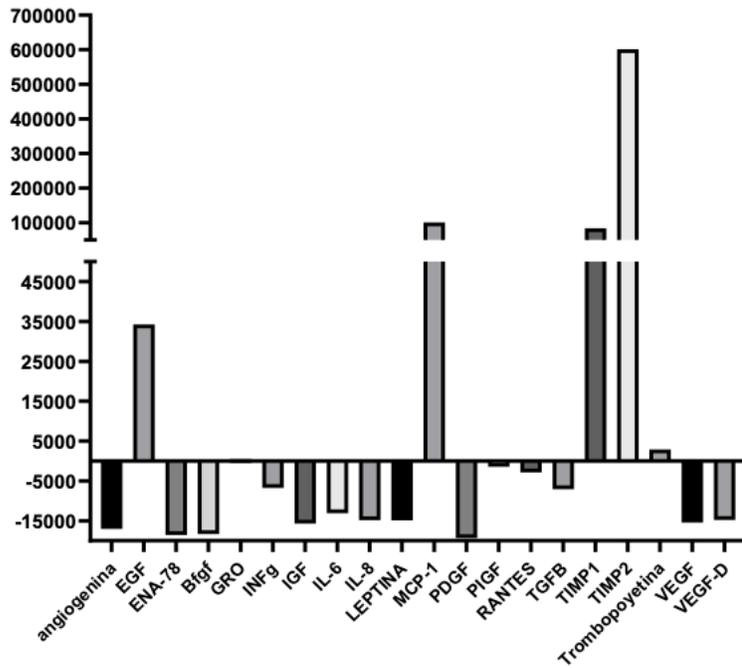
Anexo 1.- Niveles de biomarcadores en pacientes con edema macular diabético



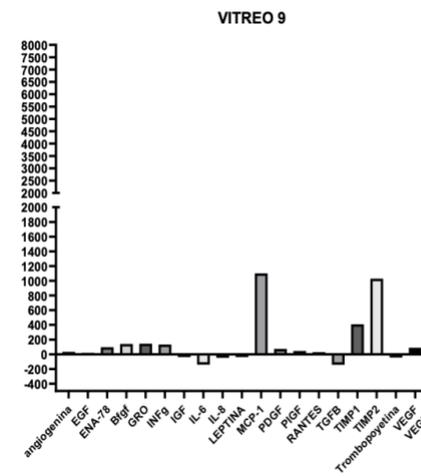
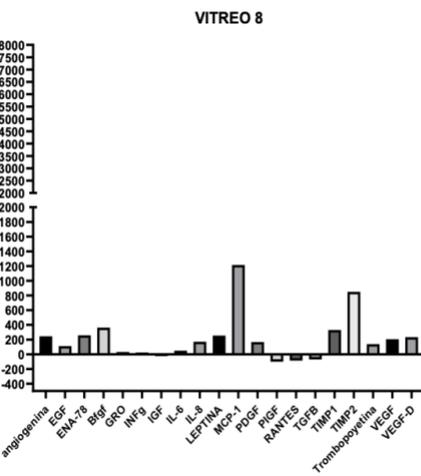
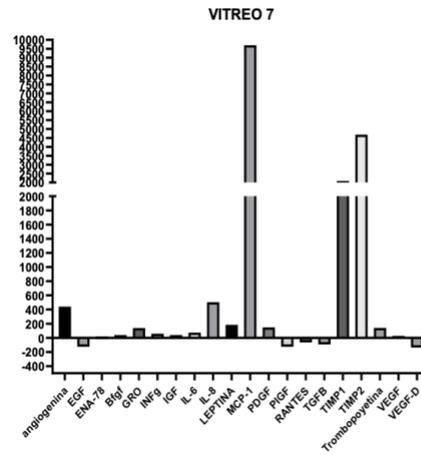
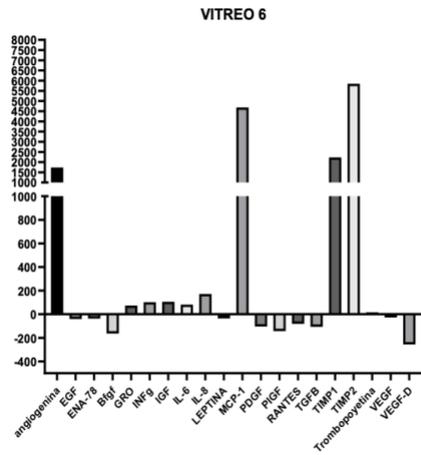
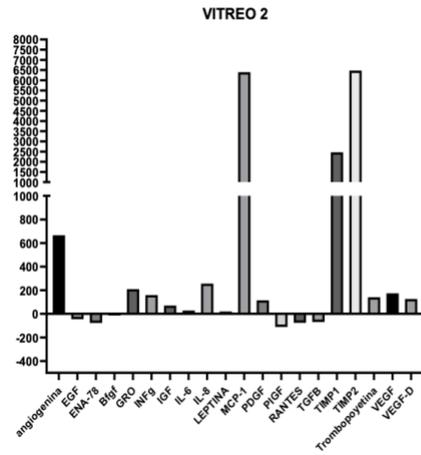
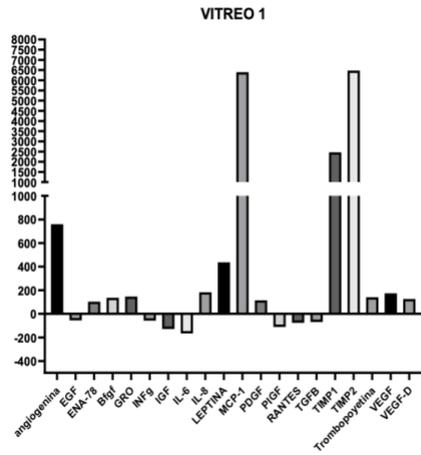
VITREO 3 EMD



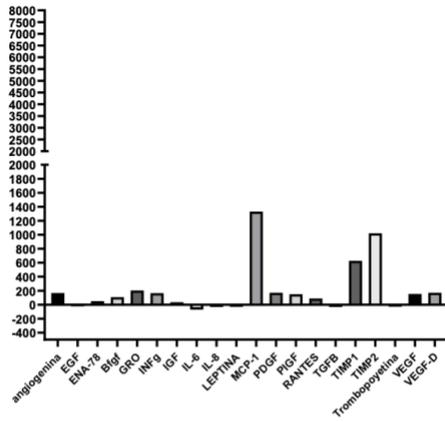
VITREO 4 EMD



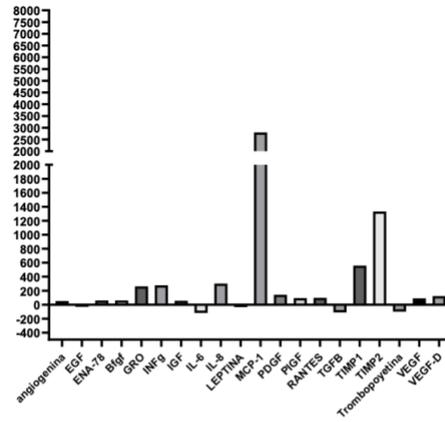
Anexo 2.- Niveles de biomarcadores en vítreo de retinopatía diabética proliferativa



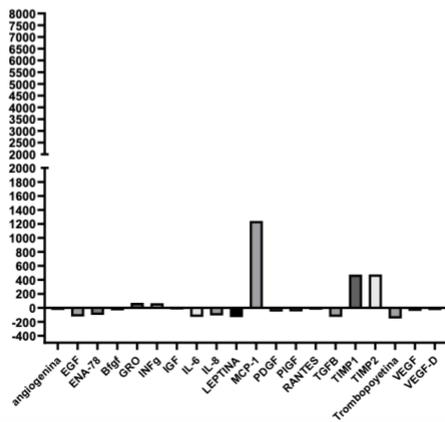
VITREO 10



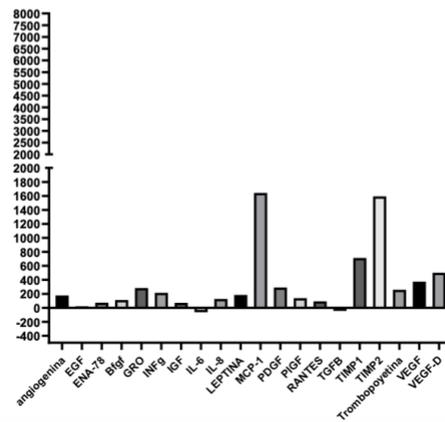
VITREO 13



VITREO 15



VITREO 16



VITREO 17

