



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
Facultad de Medicina  
División de estudios de posgrado

**“Polimorfismo inserción/delección del gen de la enzima  
convertidora de angiotensina como factor de riesgo en  
retinopatía diabética”**

T E S I S

Para obtener el título de Especialista en  
OFTALMOLOGÍA

Presenta:

KARLA EDITH BARRERA PERALES

Asesores de tesis:

Dr. Sergio Rojas Juárez

Dr. Héctor Javier Pérez Cano

Dra. Selma Alin Somilleda Ventura

Ciudad de México, Mayo del 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

DR. ALEJANDRO BABAYAN SOSA  
Profesor titular ante la UNAM  
Director Medico

DRA. ADRIANA SAUCEDO CASTILLO  
Subdirector medico

DR. FRANCISCO ORTEGA SANTANA  
Jefe de Enseñanza

DRA. INGRID PITA ORTIZ  
Subdirector de Enseñanza

DRA. CRISTINA MENDOZA  
Jefa de investigación

DR. SERGIO ROJAS JUÁREZ  
Asesor de Tesis

DR. HECTOR PEREZ CANO  
Asesor de Tesis

DRA. SELMA ALIN SOMILLEDA VENTURA  
Asesora de Tesis

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme vivir.

A mi valioso hijo por transformarme la vida, por su comprensión, y por ceder el tiempo para que mami estudie.

A mis amados padres y hermanos por su apoyo incondicional, amor infinito, por creer en mi por sobre todas las cosas e inspirarme a cumplir mis sueños.

En especial agradezco a mi padre, quien se despidió de este mundo terrenal al iniciar mi especialidad. Gracias al amor tan grande que en vida me dio, sus recuerdos inolvidables y llenos de amor. Le agradezco a Dios por la sabiduría de transformar las experiencias vividas durante su despedida y el dolor que me llevo su duelo, en resiliencia y al final poder concretar esta especialidad.

Agradezco por la sonrisa de mi padre, porque me llevo hasta esta meta, y, comprendí el significado del amor eterno.

Él está y siempre estará en mi corazón y cada logro de mi vida.

A la Fundación Hospital Nuestra Señora de La Luz I.A.P. por enriquecerme de conocimientos y brindarme sapiencia durante mi formación.

## **INDICE**

Résumen	<b>6</b>
Marco teórico	
Introducción	<b>7</b>
Retinopatía diabética	<b>7</b>
Fisiopatología	<b>8</b>
Eje RAAS y complicaciones de DM	<b>9</b>
Mecanismos de daño retiniano por ECA	<b>10</b>
Gen ECA	<b>11</b>
Planteamiento del problema	<b>12</b>
Pregunta de investigación	<b>12</b>
Hipotesis	<b>12</b>
Justificación	<b>13</b>
Objetivos generales	<b>13</b>
Objetivos particulares	<b>13</b>
Metodología	
Material	<b>14</b>
Criterios de inclusión y exclusión	<b>14</b>
Métodos	<b>15</b>
Variables de estudio	<b>17</b>
Análisis estadístico	<b>18</b>
Recursos financieros	<b>18</b>
Factibilidad del estudio	<b>18</b>
Bioseguridad	<b>18</b>
Resultados	<b>19</b>
Discusión	<b>24</b>
Conclusiones	<b>25</b>
Bibliografía	<b>26</b>

## **RESÚMEN**

**Antecedentes:** La retinopatía diabética (RD) es una de las complicaciones microvasculares más importantes a nivel ocular y el polimorfismo inserción/delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) ha sido el principal gen que predispone al desarrollo de la RD.

**Objetivo:** Determinar si el polimorfismo I/D del gen que codifica a la ECA está relacionado con la presencia de la RD e identificar el alelo con mayor riesgo.

**Métodos:** Se estudiaron 56 pacientes con RD y 72 sujetos sin RD como grupo control. Se realizó medición metabólica y antropológica a los participantes. Se obtuvo DNA de sangre completa. La identificación del polimorfismo del gen ECA se llevó a cabo por amplificación de la región polimórfica del gen, con la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos. El análisis comparativo de la frecuencia alélica y genotípica se realizó con la prueba exacta de Fisher y se calculó la razón de momios (GraphPadPrism v5.0)

**Resultados:** Se estudiaron 75 sujetos control y 79 pacientes con retinopatía diabética (RD). Los resultados de la medición metabólica fueron significativamente mayores en pacientes. Con respecto al gen ECA, el genotipo I/I resultó ser más frecuente en los pacientes (43%) con una p de 0.0123 y al determinar el OR se encontró con un riesgo de 3.22 veces más de presentar RD en los pacientes con RD y genotipo I/I.

La frecuencia del alelo I en pacientes fue del 67% y en controles de 56% sin embargo al realizar el análisis alélico no existe diferencia significativa entre ambos grupos ( $p = 0.073$ ).

**Conclusiones:** Se observó una mayor frecuencia del genotipo I/I en pacientes con RD, de igual forma, el alelo I fue mayor en pacientes que en controles, estos resultados sugieren que el genotipo I/I en pacientes con DM2 puede ser propuesto como factor de riesgo para desarrollar RD. Se sugieren más estudios que comprueben estos resultados.

## ***INTRODUCCIÓN***

La diabetes mellitus (DM) es el principal problema de salud pública con una carga económica significativa en todo el mundo. De 1990 a 2010, la retinopatía diabética (RD) se clasificó como la quinta causa más aceptada de ceguera prevenible y discapacidad visual de moderada a grave.(1) Se estima que habrá 552 millones de personas con diabetes hasta 2030. Los pacientes con DM tienen susceptibilidad a desarrollar complicaciones microvasculares como retinopatía, neuropatía y complicaciones macrovasculares de enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica.(2)

### ***RETINOPATÍA DIABÉTICA***

La RD es una de las complicaciones microvasculares de la DM que ocurre tanto en la DM tipo 1 como en la tipo 2 (DM1 y DM2). Estudios epidemiológicos indican que casi todos los pacientes con DM1 y aproximadamente el 60% de los pacientes con DM2 desarrollarán esta complicación dentro de las primeras dos décadas de inicio de la enfermedad.(3,4) La dislipidemia, la nefropatía diabética, la hipertensión y la hiperglucemia son factores de riesgo bien conocidos para la RD, se ha demostrado que el control glucémico y presión arterial previene el desarrollo y la progresión de la retinopatía diabética.(5) La RD puede comenzar a desarrollarse varios años antes de que se diagnostique clínicamente la DM2.(6) Hay pacientes diabéticos con RD que a pesar de la corta duración de la diabetes y/o el perfecto control glucémico, desarrollan esta complicación; en cambio existen pacientes diabéticos que no desarrollan RD frente a la diabetes de larga evolución y/o la hiperglucemia a largo plazo.(7) Por lo tanto, el factor genético puede explicar algunas de las variaciones en la progresión de la RD. En un estudio con gemelos monocigóticos con DM2 muestran una concordancia sustancial para el desarrollo de

la RD, lo que sugiere que los factores genéticos pueden tener un papel en la RD.  
(8)

La RD es la complicación microvascular diabética más común, una de las más graves y es la principal causa de ceguera en adultos laboralmente activos.(9) Se caracteriza por inflamación, leucostásis y microangiopatía, hiperglucemia, engrosamiento de la membrana basal que acompaña a la pérdida de pericitos, microaneurismas, disfunción de la célula endotelial, infartos microvasculares y neovascularización, que eventualmente puede conducir a la pérdida de visión debido a hemorragias y desprendimiento de la retina. Clínicamente, la RD se manifiesta como una afección no proliferativa leve con permeabilidad vascular aumentada, que progresa a RD no proliferativa moderada y grave (RDNP) con cierre vascular que luego avanza a RD proliferativa (RDP), donde se forman nuevos vasos sanguíneos en la retina y la parte posterior de la superficie del vítreo. El edema macular, el engrosamiento de la retina por las fugas hemáticas de los vasos sanguíneos, pueden desarrollarse en todas las etapas de la retinopatía. Estas condiciones finalmente conducen a una pérdida de visión irreversible. (10)

### ***FISIOPATOLOGÍA***

La visión tradicional de la fisiopatología de la RD es que el daño en la microcirculación se debe a la larga duración de la enfermedad. Sin embargo, estudios recientes indican que las lesiones en las células neuronales y gliales pueden aparecer temprano en el desarrollo de RD. Por lo tanto, los primeros años de DM son los más apropiados para la introducción de intervenciones terapéuticas efectivas para prevenir cambios irreversibles en el ojo. El tratamiento RD incluye un mayor control metabólico, terapia con láser, enfoques farmacológicos (terapias antiangiogénicas y antiinflamatorias, vitreólisis enzimática e inyecciones intravítreas) y cirugía. (11)

La RD se ha asociado a diversos factores, entre ellos, el aumento en la secreción del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), la producción de productos finales de glicación avanzada, estrés oxidativo y recientemente, se ha encontrado evidencia que sugiere que existe una relación entre RD y polimorfismos de genes de varios componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) que pueden alterar potencialmente la susceptibilidad a RD en diabetes y la posible conexión de la RD con el sistema de factores pro-angiogénicos. (12)

### ***EJE RAAS Y COMPLICACIONES DE DIABETES MELLITUS:***

El RAAS consiste en renina, angiotensinógeno (AGT), enzima convertidora de angiotensina (ECA), enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA 2), Angiotensina II (Ang II) receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R), receptor de angiotensina II tipo 2 (AT2R) y aldosterona.(13)

La activación del RAAS y la producción aumentada de Ang II tiene un efecto inhibitorio sobre la vía de transducción de señales de insulina. El Ang II afecta la homeostasis de la glucosa y está involucrado en la patogénesis de la DM a través de la inhibición de la transducción de la señal de insulina, la reducción de la absorción de glucosa, la resistencia a la insulina y la destrucción de las células beta del páncreas al inducir el estrés oxidativo.(14). El Ang II previene la fosforilación del sustrato receptor 1 de insulina (IRS-1) con la posterior disminución de la fosfatidilinositol 3 quinasa y también reduce la absorción de glucosa a través de GLUT4 que resulta en resistencia a la insulina. Además, Ang II aumenta las especies reactivas de oxígeno, lo que conduce a dañar las células  $\beta$  pancreáticas y puede afectar indirectamente la secreción de insulina del páncreas a través de la vasoconstricción y la reducción del flujo sanguíneo de los islotes. La exposición crónica a altos niveles de glucosa y grasa induce estrés oxidativo, inflamación y apoptosis con la participación de Ang II a través de AT1R en las células  $\beta$  del páncreas. Todos estos efectos resultan en el desarrollo de DM.(15) En estudios con

animales, la infusión crónica de Ang II aumenta la producción de superóxido a través de la NADH / NADPH oxidasa.(16)

El otro componente del RAAS, la aldosterona, disminuye la secreción de insulina de las células  $\beta$  en un mecanismo que implica estrés oxidativo. La disminución de la producción de Ang II y aldosterona o la inhibición de ambos receptores de AT1R y mineralocorticoides han mejorado la sensibilidad a la insulina tanto en estudios in vivo como in vitro.(17) Se ha demostrado que la inhibición de RAAS por los inhibidores de la ECA (ECA I) o los bloqueadores de AT1R previene los efectos adversos de Ang II en el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina y reduce la incidencia de DM2 de nueva aparición en individuos con hipertensión y ECV. El papel de RAAS en la patogénesis de la resistencia a la insulina en la DM2 se ha demostrado en estudios de ensayos clínicos que utilizan bloqueadores de los receptores **ECA I** o Ang II (ARB). En pacientes con DM2, se han demostrado los efectos beneficiosos de ECA I o ARB en las vías metabólicas, la enfermedad renal crónica y cardiovascular.(18)

### ***MECANISMOS DE DAÑO RETINIANO POR LA ECA***

Los bloqueadores RAAS previenen la resistencia a la insulina en algunos, pero no en todos los pacientes con DM2, lo que indica variabilidad interindividual. Los niveles más altos de actividad de la renina y la actividad de la ECA durante el curso de la diabetes provocan un exceso de angiotensina II en el ojo, arteriolas retinianas anormalmente restringidas, presión sanguínea intravascular local elevada, flujo sanguíneo retiniano reducido, mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos retinianos, neovascularización ocular y elevar la presión arterial intravascular local para acelerar el desarrollo de retinopatía.(19) Además, el mayor nivel de ECA en pacientes con retinopatía proliferativa indica un papel potencial de la ECA en el daño vascular retiniano para la RD. Los niveles de ECA están bajo control genético y el polimorfismo del gen ECA puede contribuir a la variabilidad de los niveles plasmáticos de ECA, como lo demuestra el hallazgo de que la

homocigosidad para el alelo D está fuertemente relacionada con las concentraciones plasmáticas más altas. La ECA parece estar involucrada en la promoción de la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) de las células en el proceso de fibrosis orgánica a través de la inducción de las isoformas 1 y 2 del factor de crecimiento transformante-beta (TGF-beta).(20) La EMT relacionada con TGF-beta-relacionada, también es común a los trastornos oculares fibróticos, los más destacados son la vitreoretinopatía proliferativa (PVR).(21)

### **GEN DE LA ECA**

El gen ECA localizado en el cromosoma 17q23 comprende 26 exones y 25 intrones.(22) El polimorfismo de inserción/delección del intrón 16 del gen ECA representa aproximadamente la mitad de la variación fenotípica en los niveles de ECA en plasma.(23) Se conocen más de 160 polimorfismos para el gen ECA de que la mayoría de ellos son polimorfismos de un solo nucleótido.

El polimorfismo más estudiado de ECA es un polimorfismo I/D (rs1799752) que consta de 287 pb dentro del intrón 16.(24) Este polimorfismo fue descrito por primera vez por Rigat et al (23) y su presencia está asociada con una mayor actividad de ECA en plasma. Se cree que el polimorfismo ECA I / D juega un papel importante en la patogénesis de los trastornos vasculares.(25) La presencia del alelo D se asocia con la actividad de ECA más alta en comparación con la presencia del alelo I asociado a una actividad de ECA más baja.(26) Este polimorfismo contribuye a la patogénesis de la DM y sus complicaciones. El polimorfismo del gen ECA no parece alterar la susceptibilidad a la RD en la diabetes tipo 1.(10) El genotipo ECA DD se ha asociado con una respuesta más baja a la insulina en una prueba oral de tolerancia a la glucosa en pacientes con DM2.(27) El gen ECA ha sido el principal gen candidato probable que predispone al desarrollo de la retinopatía diabética.(28) Durante décadas, varios estudios han informado sobre la relación entre ECA, polimorfismos del gen AGT y DR, (29)(30) sin embargo, las conclusiones siguen siendo inconsistentes.

## ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

La retinopatía diabética es la complicación más común en pacientes con diabetes mellitus y es una de las complicaciones microvasculares más dañinas en estos pacientes, sigue siendo una causa importante de morbilidad visual entre los países desarrollados y subdesarrollados. En la literatura se encuentran múltiples estudios que evidencian la relación etiopatogénica entre la ECA y la retinopatía diabética, sin embargo, los estudios relacionados con el polimorfismo de la ECA I/D (rs1799752) son escasos y los reportes no son concluyentes sobre la relación con la RD.

## ***PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN***

¿Está relacionado el polimorfismo I/D (rs1799752) del gen que codifica a la enzima convertidora de angiotensina con la presencia de retinopatía diabética?

## ***HIPOTÉISIS***

Existe una relación clínica comprobable entre el polimorfismo I/D (rs1799752) del gen ECA y el estadio de la retinopatía diabética.

## ***JUSTIFICACIÓN***

El polimorfismo deleción/inserción del gen ECA ha sido el principal gen candidato probable que predispone al desarrollo de la retinopatía diabética, sin

embargo, existe poca evidencia que corrobore estos resultados, aunque está demostrada la participación de la ECA en la etiopatogenia del padecimiento. Dado el alto volumen de atención a pacientes con complicaciones de retinopatía diabética y la alta prevalencia de la misma, es necesario determinar de forma objetiva la influencia de la ECA para su posterior aplicación en tratamientos para este grupo de pacientes.

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si el polimorfismo deleción/inserción del gen que codifica a la ECA está relacionado con la presencia de la RD e identificar el alelo con mayor riesgo.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Mostrar las variables antropológicas de los pacientes
- Describir las mediciones metabólicas de los pacientes
- Determinar la agudeza visual en ambos grupos
- Identificar el genotipo más frecuente en ambos grupos y determinar el riesgo de padecer RD

### **MATERIAL Y METODOS**

Estudio de casos y controles. Prospectivo, descriptivo, comparativo y transversal

Se calculó el tamaño de muestra por muestreo no probabilístico

Grupo control formado por 75 sujetos y grupo de estudio por 79 pacientes.

### **GRUPO DE ESTUDIO**

Criterios de inclusión:

- Pacientes con DM2 por más de 5 años del diagnóstico (criterios de la American Diabetes Association)
- RD en cualquier estadio según la American Academy of Ophthalmology 2007.

#### Criterios de exclusión

- Pacientes en tratamiento con inhibidores de la ECA y/o aplicación de cualquier antiangiogénico intravítreo.
- No aceptar participar y/o no firmar el consentimiento informado
- Pacientes que no cumplieron con la toma de muestra de sangre.

#### **GRUPO CONTROL**

#### Criterios de inclusión:

- Sujetos sin diagnóstico de DM1/2
- Sin diagnóstico de hipertensión arterial sistémica
- Sin enfermedad ocular microangiopática.

#### **Criterios de exclusión**

- Sujetos diagnosticados con hipertensión arterial sistémica y/o DM1 o DM2 durante el estudio.
- Antecedente de cáncer de cualquier tipo.
- Sujetos con antecedente de infarto agudo al miocardio.
- Enfermedad ocular de etiología microangiopática, retinopatía independiente de la diabética.
- No aceptar el consentimiento informado
- Sujetos ~~Pacientes~~ que no cumplieron con la toma de muestra de sangre.

El protocolo se sometió y fue aprobado por el comité de Ética y cumple con los lineamientos de la declaración de Helsinki.

Todos los participantes aceptaron participar y firmaron una carta de consentimiento informado.

## **METODOLOGÍA**

Se obtuvo una muestra de sangre completa, utilizando EDTA como anticoagulante y se procedió a la extracción de DNA utilizando el kit QIAamp mini kit® (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó la PCR para la amplificación de los fragmentos requeridos, la mezcla de reacción se compone de HotStarTaq Master Mix Polimerase (QIAGEN Sciences, Maryland, USA), (con 2.5 U de Taq polimerasa, 1.5 nM de Mg<sub>2</sub>Cl, 200uM de cada dNTP, 1X del buffer de reacción), 5.8 ml de agua, 0.3µL de los oligonucleótidos (**tabla 1**), 2 µL de DNA (5 a 20ng).

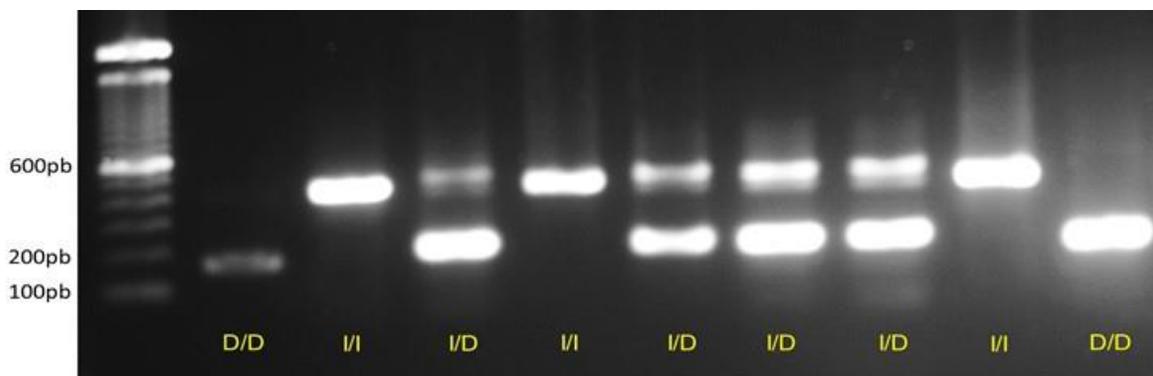
**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento del gen XRCC1.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Tm</b>
<b>Inserción/</b>	5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT3'	Alelo D 190pb	67.9
<b>delección</b>	5'GACGTGGCCATCACATTCGTCAGAT3'	Alelo I 490pb	

La amplificación de los fragmentos de DNA se realizó utilizando el siguiente programa: 95°C/10 min, y 38 ciclos a 95°C/1 min, Tm(67.9)/1 min, 72°C/1 min y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/10min. La reacción se realizó en un termociclador AXYGEN MAXYGENE PCR System 2400 (Perkin Elmer Co. Norwalk, Connecticut).

Los **productos de PCR se analizarán por electroforesis** en gel de agarosa al 1.5% a 90V durante 40 minutos usando como marcador de peso molecular el TrackIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen, L.T.), Gel RedNucleicAcidStain™ de Biotium como agente intercalante, se revelará y fotodocumentará bajo luz

ultravioleta utilizando el transiluminador de UVP BioLite™ MultiSpectralSource con el programa LaunchVision Works LS (**Figura 1**).



**Figura 1.** Electroforésis en gel de agarosa

Las valoraciones clínicas y de laboratorio, estudiadas en este protocolo, se enlistan en la **tabla 2**

**Tabla 2. Variables estudiadas**

Variable	Tipo de variable	Nivel de medición	Unidad de expresión
Edad	Cuantitativa	Continúa	Años
Género	Cualitativa	Nominal	Femenino / Masculino
Índice de masa corporal	Cuantitativa	Continuo	Metros cuadrados (m2)
Categoría de peso	Cualitativa	Nominal	Bajo peso, normal, sobrepeso, obesidad 1, obesidad 2
Peso	Cuantitativa	Continúa	kilogramos
Talla	Cuantitativa	Continúa	metros
Ojo afectado	Cualitativa	Nominal	Izquierdo / Derecho/ Ambos
Retinopatía diabética	Cualitativa	Nominal	Según ETDRS
Glucosa plasmática en ayuno	Cuantitativa	Continúa	mg/dL
Úrea	Cuantitativa	Continúa	mg/dL
Creatinina	Cuantitativa	Continúa	mg/dL
Acido úrico	Cuantitativa	Continúa	mg/dL
Colesterol	Cuantitativa	Continúa	mg/dL
Triglicéridos	Cuantitativa	Continúa	mg/dL
Leucocitos	Cuantitativa	Continúa	mg/dL
Hemoglobina glucosilada	Cuantitativa	Continúa	% nivel

<b>Historia familiar de diabetes</b>	Cualitativa	Nominal	Si / No
<b>Familiar afectado con DM</b>	Cuantitativa	Nominal	Ninguno / Madre / Padre / Ambos
<b>Duración de la diabetes</b>	Cuantitativa	Continua	Años
<b>Historia de enfermedad coronaria y complicaciones</b>	Cualitativa	Nominal	SI / NO
<b>Hábito tabáquico</b>	Cualitativa	Nominal	SI / NO
<b>Años de tabaquismo</b>	Cuantitativa	Continúa	Años
<b>Agudeza visual</b>	Cuantitativa	Continua	Valorada por cartilla de Sellen a 20 pies
<b>Presión intraocular</b>	Cuantitativa	Continua	Tonometría/ Goldman
<b>Presión arterial</b>	Cualitativa	Continúa	Sistólica / diastólica
<b>Frecuencia cardíaca</b>	Cuantitativa	Continúa	Latidos por minuto
<b>Uso de medicamentos</b>	Cualitativa	Nominal	Medicamento administrado

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

- Se realizó estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central, antes de realizar los análisis comparativos, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar el comportamiento de los datos, para comparar datos demográficos entre grupos, se realizaron las pruebas adecuadas para datos paramétricos y no paramétricos, la comparación de la frecuencia alélica y frecuencia genotípica entre grupos se realizó con Chi2. Se tomó como diferencia significativa un valor de  $p < 0.05$  y se calculó la razón de momios (OR). El software utilizado para el análisis fue el GraphPad Prism V5.0.

## **RECURSOS FINANCIEROS**

- El estudio se realizó utilizando los recursos económicos, infraestructura, y mobiliario de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, I.A.P.

### **FACTIBILIDAD DEL ESTUDIO**

- Es un proyecto plausible, se cuenta con el equipo y reactivos necesarios para realizarlo de forma efectiva. Fue posible alcanzar la meta trazada, la existencia de los recursos facilitó alcanzarla en los tiempos preestablecidos.

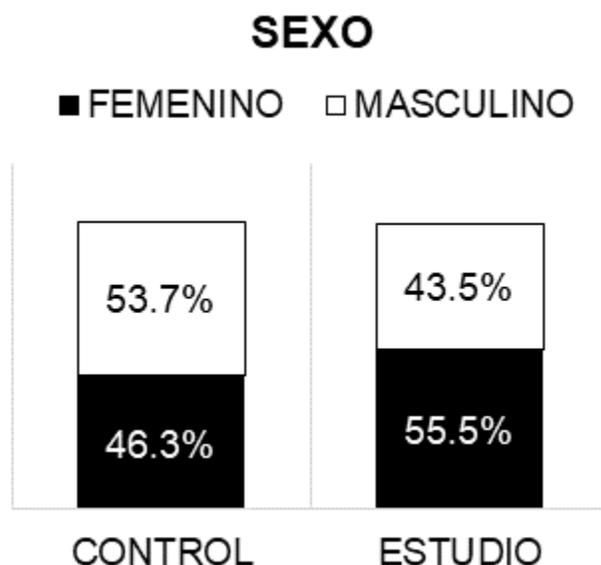
### **BIOSEGURIDAD**

- Las valoraciones clínicas y de laboratorio realizados en el estudio son de carácter no invasivo por lo que no representan ningún riesgo para los participantes. A excepción de la flebotomía, en este caso, se siguieron los protocolos adecuados y la observancia de las normas.

### **RESULTADOS**

Se estudiaron 75 sujetos control y 79 pacientes con retinopatía diabética (RD). En el grupo control se incluyeron pacientes con diagnóstico de catarata (45), pterigion (8), queratocono (1), patología palpebral (11), distrofia corneal (1) y lesión palpebral (9).

En la **figura 2** se muestra la distribución de sexo en ambos grupos y se observa una distribución muy homogénea entre pacientes y controles ( $p= 0.20$ ; Chi cuadrada)



**Figura 2.** Distribución por sexo en los grupos de casos y controles

En cuanto a la medición antropométrica (**tabla 3**) se encontró que la edad en el grupo control tuvo una media de 56.78 años (DE  $\pm$  17.04 años), mientras que en grupo estudio fue de 57.66 años (DE  $\pm$  13.24) siendo ambos grupos comparables.

**Tabla 2.** Medición antropométrica

	CONTROL	ESTUDIO	p value
Peso	69.88 kg $\pm$ 15.98	69.54 kg $\pm$ 14.48	0.3978
Talla	1.60 m $\pm$ 0.09	1.586 m $\pm$ 0.08	0.2444
IMC	27.13 $\pm$ 4.95	27.66 $\pm$ 5.74	0.7955

La media del peso en los controles fue de 69.88 kilogramos (kg) (DE  $\pm$  15.98 kg), mientras que en los casos fue muy similar, 69.54 kg (DE  $\pm$  14.48). La talla fue medida en metros (m) y tuvo una media en los controles de 1.60 m (DE  $\pm$  0.093) y en casos fue de 1.586 m (DE  $\pm$  0.084 m). Sin embargo no existe diferencia significativa entre ambos grupos. La media del índice de masa corporal en controles

fue de 27.13 kg/m<sup>2</sup> (DE ± 4.955 kg/m<sup>2</sup>) y en casos tuvo una media de 27.66 kg/m<sup>2</sup> (DE ± 5.748).

En cuanto a la medición metabólica que se llevo a cabo mediante exploración física y toma de muestra de sangre completa y su procesamiento, se recabaron los datos mostrados en la **Tabla 4**. Como era de esperarse se encontró la glucosa plasmática más elevada en los casos (181.7 mg/dl ± 79.11), mientras que en controles fue de 106mg/dl (DE ± 12.52), lo cual según la American Diabetes Association 2021 se encuentra en categoría de prediabetes. 5 sujetos fueron excluidos por presentar glucosa en ayunas >110 mg/dl.

Debido al componente metabólico y al consecuente daño retiniano y lo esperado en el riñón, se calculó la Tasa de filtración glomerular en los casos, y se obtuvo un resultado de 46.98 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, lo cual corresponde a enfermedad renal crónica estadio IIIA según las pautas de la Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)

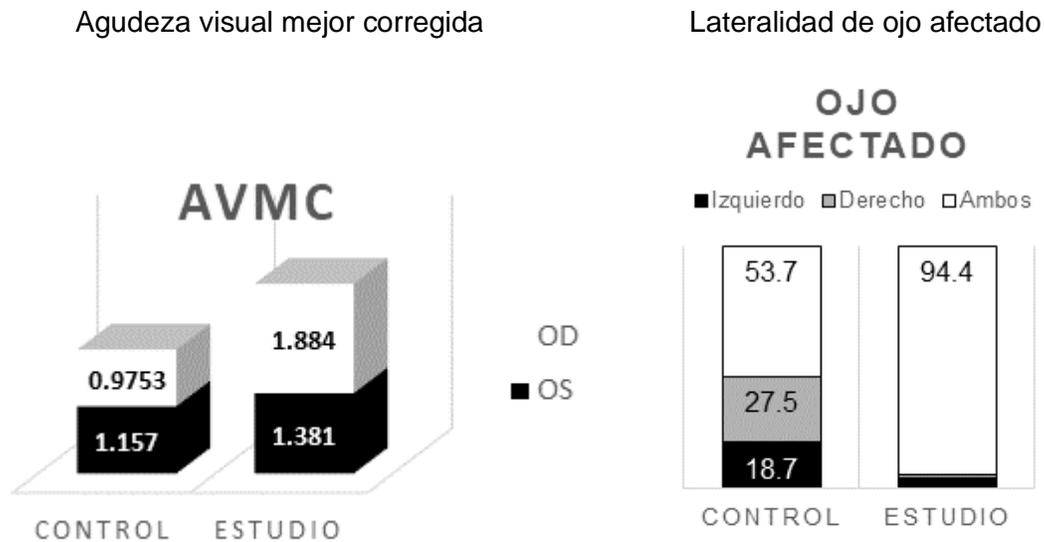
El resto de la medición biométrica se observó más elevada en el grupo de pacientes, con una diferencia estadísticamente significativa en todos parámetros metabólicos (p <0.05), excepto las cifras de colesterol total.

**Tabla 3.** Medición metabólica

	<b>Control</b>	<b>Estudio</b>	<b>p value</b>
Glucosa	106.4 mg/dl ± 12.51	181.7 mg/dl ± 79.11	<0.0001*
Urea	33.38 mg/dl ±10.45	59.56 mg/dl ± 32.54	<0.0001*
Creatinina	0.93 mg/dl ± 0.72	1.69 mg/dl ±1.97	<0.0001*
Acido úrico	5.95 mg/dl ±1.63	6.53 mg/dl ±1.89	0.0349*
Colesterol	194.6 mg/dl ± 40.51	198.4 mg/dl ± 42.13	0.5581
Triglicéridos	165.7 mg/dl ± 98.02	218.4mg/dl ± 155.2	0.0054*
Sistólica *	125.5mmHg ±15.14	136.2 ± 25.44	0.0001*
Diastólica *	77.30mmHg ± 7.94	80.88 ± 11.93	0.0353*
Frecuencia cardiaca	70.00 lpm ± 11.17	77.06 lpm ±12.64	0.0004*

La agudeza visual mejor corregida (AVMC) fue más baja en el ojo derecho (1.884 Logmar) y en el ojo izquierdo de los controles (1.157 Logmar). Respecto al ojo afectado por RD, se encontró que en el 94.4% de los casos tuvieron una afectación bilateral, mientras que solo el 53.7% de los controles tuvieron afectación bilateral. en los pacientes estudio y se mostró mejor en el ojo izquierdo en los controles.

**Figura 3**

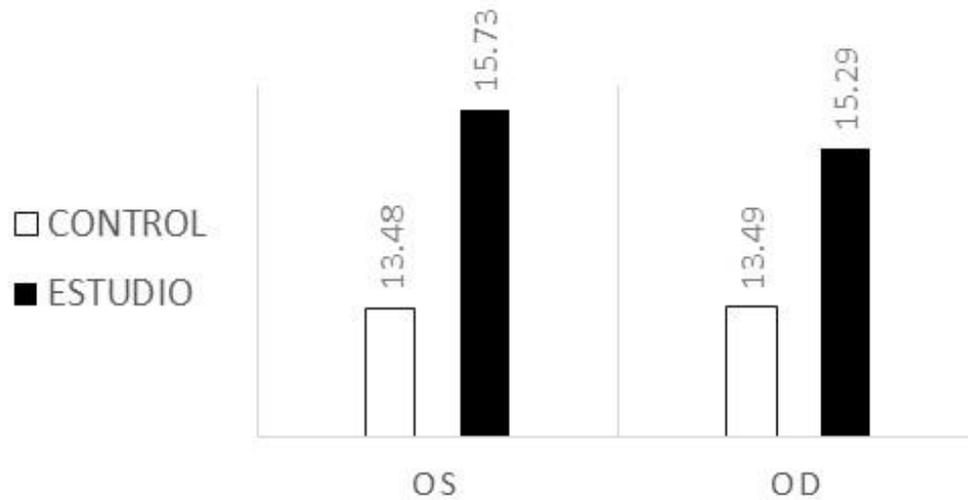


**Figura 3.** Agudeza visual mejor corregida en LogMar y porcentaje de lateralidad de ojo afectado

Al ser una patología sistémica ambos ojos fueron afectados en el 94.4% de los casos, y tuvieron afección bilateral el 53.7% de los controles, lo cual denota que al buscar atención oftalmológica la mayoría se encuentran ya con daño retiniano importante y en necesidad de tratamiento oftalmológico y de sustitución renal con prontitud.

Se tomó la presión intraocular, obteniendo en cifras muy similares de tensión intraocular entre ambos grupos. **Figura 4**

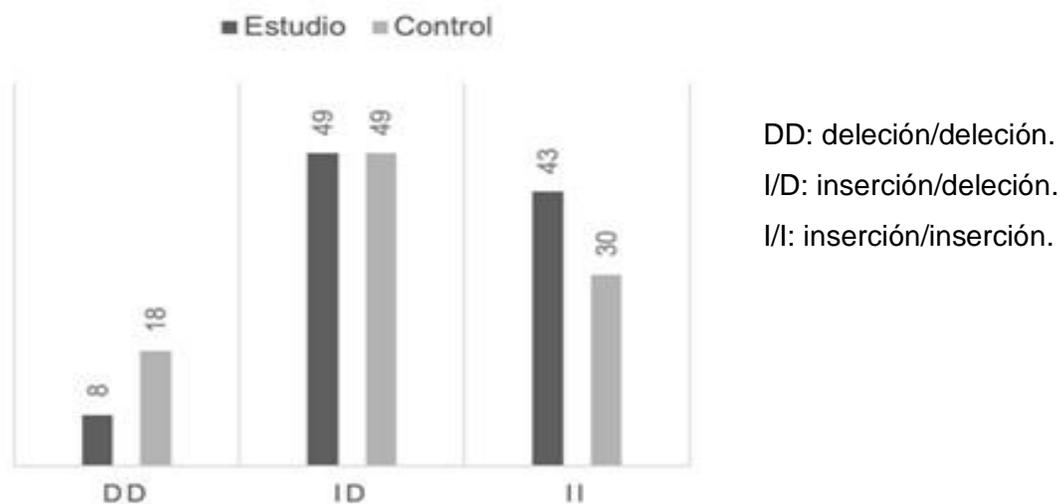
## PRESIÓN INTRAOCULAR



**Figura 4.** Presión intraocular medida con tonómetro de Goldmann.

Se realizó el análisis de la frecuencia genotípica (I/D, D/D, I/I), (**Figura 5**) mediante prueba de chii cuadrada, y se encontró la relación del genotipo I/I en el grupo estudio con el desarrollo de la RD, teniendo una diferencia estadísticamente significativa comparado con los controles ( $p$  0.0123). Al determinar el riesgo, este resultó con 3.22 veces más de presentar RD en los pacientes con genotipo I/I.

## FRECUENCIA GENOTÍPICA



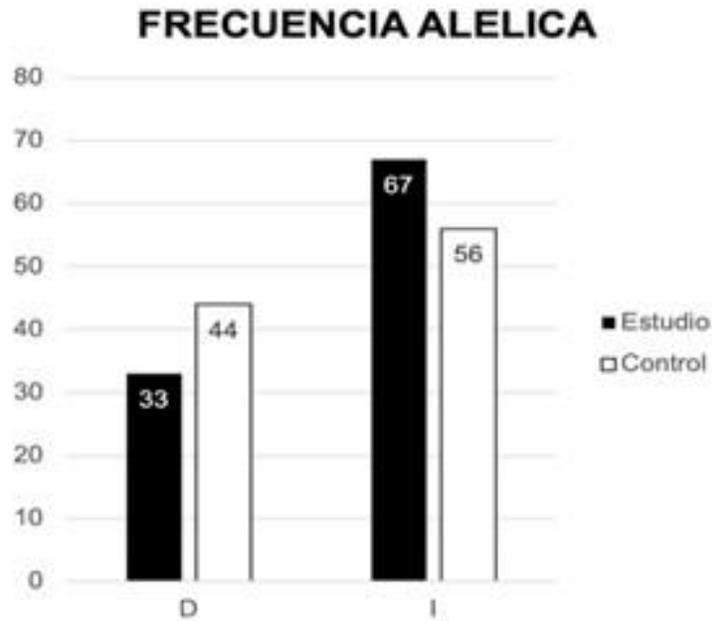
Polimorfismo	Controles n(%)	Pacientes n(%)	p	OR
DD	14 (18.66)	6 (7.59)	0.934	
ID	37 (49.34)	39 (49.36)	0.079	0.07
II	24 (32)	34 (43.03)	0.0123	3.22

**Figura 5.** Frecuencias genotípicas de casos y controles en polimorfismo I/D del gen ECA

\*Se utilizó la prueba exacta de Fisher. Comparando con controles. Un valor  $p \leq 0,05$  fue considerado significativo. Se observa mayor proporción del genotipo I/I en pacientes que en controles

Al realizar el análisis de frecuencia alélica mediante prueba exacta de Fisher notamos que se pierde la significancia, eso es algo muy interesante, porque el genotipo I/I tiene 3.22 veces mas de riesgo de desarrollar RD, entonces, esperaríamos que el mismo alelo I (inserción) estuviera relacionado con su presencia, lo cual , no es así. Se observa una mayor proporción del alelo I en pacientes que en controles sin embargo no tiene significancia significativa. **Figura**

**6**



Alelo	Controles n (%)	Pacientes n(%)	p
D	49 (44)	47 (33)	
I	63 (56)	97 (67)	0.073

**Figura 6.** Frecuencia alélica de casos y controles en polimorfismo I/D del gen ECA

## **DISCUSIÓN**

El estudio actual demuestra por primera vez en sujetos mexicanos con DMT2, la asociación del polimorfismo ACE I/I y la RD, además la influencia positiva del alelo I en la severidad de RD.

Estos resultados difieren con los encontrados por Daniel P. K y cols,(31) quienes reportan que no existe una relación entre el polimorfismo I/D de la ECA e incluso I/I confiere una protección significativa contra la nefropatía diabética y se afirma que no es un marcador útil, descartando su papel en la determinación de la susceptibilidad genética o la gravedad de la RD.

Nagui et al. (32) tampoco observaron ninguna asociación del polimorfismo ACE I/D en la población caucásica y Gutiérrez et al (33) niegan la asociación en población mediterránea con DMT2. En sujetos diabéticos paquistaníes, Saleem S et al (34) encontraron al genotipo I/D asociado con la susceptibilidad de desarrollar RD en sujetos con DMT2.

Matsumoto et al (35) el polimorfismo D/D de la ECA con RD avanzada, y la frecuencia del alelo D es significativamente más alta en RD que en los controles, siendo lo contrario en nuestro estudio.

La razón de estos resultados contradictorios no está clara, entonces podemos inferir que la raza juega el papel más importante, debido a la etiología multifactorial de la diabetes mellitus.

Nuestros datos indican que el GENOTIPO Inserción inserción se muestra como factor de riesgo a desarrollar RD, entrando en controversia con algunos estudios publicados, sin embargo, con los datos obtenidos no es posible asociar un alelo como factor de riesgo para el desarrollo de RD, a pesar de que, nuestros datos indican que el genotipo I/I puede ser el candidato como factor de riesgo, entrando en controversia con algunos estudios publicados

Por otro lado, los resultados nos han mostrado que la heterocigocidad puede tener un papel muy importante en el desarrollo de la RD por lo que es importante continuar con el estudio, ampliando el tamaño de la muestra para corroborar los hallazgos, además, se necesitan más estudios en sujetos mexicanos que debatan estos resultados.

## **CONCLUSIONES**

Nuestros resultados en sujetos mexicanos se proponen para ser utilizados como tamizaje. Al determinar el genotipo y alelo de los pacientes al momento de ser diagnosticados con RD, nos pueden servir como indicador de que esperar en el transcurso de su retinopatía, así como ser una guía terapéutica en pacientes con genotipo I/I; en ellos sería interesante saber si escalar el tratamiento de manera temprana, favorecería o no, mantener la visión y evitar o retrasar la aparición de glaucoma neovascular, desprendimiento de retina traccional y phtisis bulbi en estos pacientes.

Por lo tanto nuestros resultados abren un panorama de tamizaje y aplicación terapéutica en estos pacientes, por lo cual sería necesario iniciar más estudios que nos dicten las pautas a seguir.

## BIBLIOGRAFIA

1. Khavandi K, Amer H, Ibrahim B, Brownrigg J. Strategies for preventing type 2 diabetes: an update for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis*. 2013 Sep;4(5):242–61.
2. Bourne RRA, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2013 Dec;1(6):e339-49.
3. Qiao YC, Pan YH, Xu Y, Zhang XX, Zhao HL. Interaction of renin-angiotensin system gene polymorphisms with hypertension in Chinese patients with type 1 diabetes and retinopathy. *Oncotarget*. 2018 Jan 26;9(7):7582–9.
4. Saleem S, Azam A, Maqsood SI, Muslim I, Bashir S, Fazal N, et al. Role of ACE and PAI-1 Polymorphisms in the Development and Progression of Diabetic Retinopathy. *PLoS One*. 2015 Dec 14;10(12):e0144557.
5. Nikzamir A, Rashidi A, Esteghamati A, Nakhjavani M, Golmohammadi T, Khalilzadeh O. The relationship between ACE gene insertion/deletion polymorphism and diabetic retinopathy in Iranian patients with type 2 diabetes. *Ophthalmic Genet*. 2010 Sep 21;31(3):108–13.
6. Wong TY, Klein R, Islam FMA, Cotch MF, Folsom AR, Klein BEK, et al. Diabetic Retinopathy in a Multi-ethnic Cohort in the United States. *Am J Ophthalmol*. 2006 Mar;141(3):446-455.e1.
7. Cho H, Sobrin L. Genetics of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2014 Aug 21;14(8):515.
8. Leslie RDG, Pyke DA. Diabetic Retinopathy in Identical Twins. *Diabetes*. 1982 Jan 1;31(1):19–21.
9. Neroev V v., Chesnokova NB, Okhotsimskaya TD, Ryabina M v., Fadeeva VictoriaA, Pavlenko TA, et al. The effect of intravitreally administered angiogenesis inhibitor on the concentration of angiotensin-converting enzyme in the blood serum and lacrimal fluid in patients with diabetic macular edema. *Problems of Endocrinology*. 2019 Jun 30;65(2):72–8.
10. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Retinopathy in Diabetes. *Diabetes Care*. 2004 Jan 1;27(suppl\_1):s84–7.
11. Foureaux G, Nogueira BS, Coutinho DCO, Raizada MK, Nogueira JC, Ferreira AJ. Activation of endogenous angiotensin converting enzyme 2 prevents early injuries induced by hyperglycemia in rat retina. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2015 Dec;48(12):1109–14.
12. Clermont A, Bursell SE, Feener EP. Role of the angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of diabetic retinopathy: effects of blood pressure control and beyond. *J Hypertens*. 2006 Mar;24(Suppl 1):S73–80.
13. Rahimi Z. The Role of Renin Angiotensin Aldosterone System Genes in Diabetic Nephropathy. *Can J Diabetes*. 2016 Apr;40(2):178–83.
14. Rahimi Z, Moradi M, Nasri H. A systematic review of the role of renin angiotensin aldosterone system genes in diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic neuropathy. *J Res Med Sci*. 2014 Nov;19(11):1090–8.
15. Silva MG da, Barbosa SLF, Silva DS, Bezerra IBM, Alves Bezerra É, Coelho AG, et al. Bioactive Natural Products against Systemic Arterial Hypertension: A Past 20-Year Systematic and Prospective Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022 Jun 20;2022:1–21.

16. Merker L, Bautsch BW, Ebert T, Guthoff M, Isermann B. Nephropathy in Diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2021 Aug 4;129(S 01):S60–3.
17. Luther JM, Brown NJ. The renin–angiotensin–aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Dec;32(12):734–9.
18. Underwood PC, Adler GK. The Renin Angiotensin Aldosterone System and Insulin Resistance in Humans. *Curr Hypertens Rep*. 2013 Feb 15;15(1):59–70.
19. Qiao Y chao, Wang M, Pan Y hong, Zhang X xi, Tian F, Chen Y ling, et al. The relationship between *ACE/AGT* gene polymorphisms and the risk of diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2018 Jan 29;19(1):147032031775295.
20. el Chaar M, Chen J, Seshan S v., Jha S, Richardson I, Ledbetter SR, et al. Effect of combination therapy with enalapril and the TGF- $\beta$  antagonist 1D11 in unilateral ureteral obstruction. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2007 Apr;292(4):F1291–301.
21. Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, et al. Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Receptor Blockers on Cardiac Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Circulation*. 2005 May 24;111(20):2605–10.
22. Rahimi Z, Felehgari V, Rahimi M, Mozafari H, Yari K, Vaisi-Raygani A, et al. The frequency of factor V Leiden mutation, ACE gene polymorphism, serum ACE activity and response to ACE inhibitor and angiotensin II receptor antagonist drugs in Iranians type II diabetic patients with microalbuminuria. *Mol Biol Rep*. 2011 Mar 19;38(3):2117–23.
23. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation*. 1990 Oct 1;86(4):1343–6.
24. Rahimi Z. ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy. *J Nephrothol*. 2012 Oct;1(3):143–51.
25. Haider MZ, Devarajan LV, Al-Essa M, Kumar H. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism in Kuwaiti Children with Retinopathy of Prematurity. *Neonatology*. 2002;82(2):84–8.
26. Rahimi Z, Hasanvand A, Felehgari V. Interaction of *MTHFR* 1298C with *ACE* D Allele Augments the Risk of Diabetic Nephropathy in Western Iran. *DNA Cell Biol*. 2012 Apr;31(4):553–9.
27. Thakur S, Sharma V, Kaur D, Purkait P. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Insertion/Deletion (I/D) Polymorphism as a Conjoint Regulator of Coagulation, Fibrinolytic, and RAAS Pathway in Infertility and Associated Pregnancy Complications. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2022 Nov 29;2022:1–10.
28. Raza ST, Abbas S, Chandra A, Singh L, Rizvi S, Mahdi F. Association of angiotensin-converting enzyme, CYP46A1 genes polymorphism with senile cataract. *Oman J Ophthalmol*. 2017;10(1):21–5.
29. Cheema BS, Kohli HS, Sharma R, Shah VN, Bhansali A, Khullar M. Angiotensin-converting enzyme gene variants interact with the renin-angiotensin system pathway to confer risk and protection against type 2 diabetic retinopathy. *J Diabetes Investig*. 2013 Jan;4(1):103–4.

30. Agardh E, Gaur LK, Lernmark Å, Agardh CD. HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 subtypes or ACE gene polymorphisms do not seem to be risk markers for severe retinopathy in younger Type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications*. 2004 Jan;18(1):32–6.
31. Ng DPK, Tai BC, Lim XL. Is the Presence of Retinopathy of Practical Value in Defining Cases of Diabetic Nephropathy in Genetic Association Studies? *Diabetes*. 2008 Sep 1;57(9):2541–6.
32. Nagi DK, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism, and diabetic retinopathy in subjects with IDDM and NIDDM. *Diabet Med*. 1995 Nov;12(11):997–1001.
33. Gutiérrez C, Vendrell J, Pastor R, Llor C, Aguilar C, Broch M, et al. Angiotensin I—converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in non—insulin-dependent diabetes mellitus. Lack of relationship with diabetic nephropathy and retinopathy in a caucasian mediterranean population. *Metabolism*. 1997 Aug;46(8):976–80.
34. Saleem S, Azam A, Maqsood SI, Muslim I, Bashir S, Fazal N, et al. Role of ACE and PAI-1 Polymorphisms in the Development and Progression of Diabetic Retinopathy. *PLoS One*. 2015 Dec 14;10(12):e0144557.
35. Matsumoto A, Iwashima Y, Abiko A, Morikawa A, Sekiguchi M, Eto M, et al. Detection of the association between a deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme and advanced diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000 Dec;50(3):195–202.