



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y
NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD**

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**Citoquinas en lágrimas como biomarcadores en enfermedades
cardiometabólicas: Diabetes Mellitus tipo II y enfermedad
coronaria**

Rafael J. Jiménez López

Enero, 2026

Directores:

Dr. Francisco Javier Pavón Morón

Dr. José Lorenzo Romero Trevejo

Tutor/a

Dr. Manuel F. Jiménez Navarro





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y
NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD**

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**Citoquinas en lágrimas como biomarcadores en enfermedades
cardiometabólicas: Diabetes Mellitus tipo II y enfermedad
coronaria**

Rafael J. Jiménez López

Enero, 2026

Directores:

Dr. Francisco Javier Pavón Morón

Dr. José Lorenzo Romero Trevejo

Tutor/a

Dr. Manuel F. Jiménez Navarro





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Rafael José Jiménez López

 <http://orcid.org/0000-0003-4595-5735>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña Rafael José Jiménez López

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA INVESTIGACION TRASLACINAL Y NUEVAS TECNOLOGIAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: **"Citoquinas en lágrimas como biomarcadores en enfermedades cardiometabólicas: Diabetes Mellitus tipo II y enfermedad coronaria"**

Realizada bajo la tutorización de Dr Manuel F. Jiménez Navarro y dirección de Dr Francisco Javier Pavón Morón y José Lorenzo Romero Trevejo

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 8 de noviembre de 2025

Fdo.: Rafael J Jiménez López Doctorando/a	Fdo.: Manuel F. Jiménez Navarro Tutor/a
Fdo.: Francisco Javier Pavón Morón Directores de tesis	Fdo.: José Lorenzo Romero Trevejo

D. MANUEL F. JIMÉNEZ NAVARRO,

Catedrático/a de Cardiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

D. FRANCISCO JAVIER PAVÓN MORÓN,

Co-investigador responsable del grupo investigador A-03 IBIMA BIONAND

y

D. JOSÉ LORENZO ROMERO TREVEJO

Facultativo especialista de Área de Oftalmología e investigador postdoctoral

CERTIFICA/N Que D RAFAEL JOSÉ JIMÉNEZ LÓPEZ

ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi dirección los datos clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: "Citoquinas en lágrimas como biomarcadores en enfermedades cardiometabólicas: Diabetes y enfermedad coronaria", que considero tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y que la publicación en coautoría que avala la presentación de esta tesis y cuya referencia/s es/son:

1. Jiménez-López R, Romero-Trevejo JL, Fernández-Romero L, Martín-Chaves L, Romero-Cuevas M, Molina-Ramos AI, Sánchez-Quintero MJ, Murri M, Costa F, Bodí V, et al. Differential Ophthalmological Profile in Patients with Coronary Artery Disease Coexisting with Type 2 Diabetes Mellitus: Elevated Tear Cytokine Concentrations. *Journal of Clinical Medicine*. 2024; 13(16):4906. <https://doi.org/10.3390/jcm13164906>

2. Jiménez-López R, Martín-Chaves L, Gutiérrez-García ÁM, Carmona-Segovia ADM, Mora-Ordoñez B, Sánchez-García AM, Fernández-Romero L, Murri M, Sánchez-Quintero MJ, Berteli-García G, Sánchez-Chaparro MÁ, Bodí V, Rodríguez-Capitán J, Jiménez-Navarro M, Pavón-Morón FJ, Romero-Trejejo JL. Distinct cytokine profiles in plasma and tears highlight ophthalmologic inflammation in type 2 diabetes without retinopathy. *Front Med (Lausanne)*. 2025 Sep 15;12:1631334. doi: 10.3389/fmed.2025.1631334. PMID: 41030257; PMCID: PMC12477169.

no ha sido utilizada en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en

Málaga 3 de octubre 2025.

Firman todos

Director/es

Tutor

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mis hermanas, por la formación, el apoyo y los valores transmitidos a lo largo de toda mi vida, que han sido fundamentales tanto en el ámbito personal como profesional.

A mis directores de tesis, Javi y Pachi, por su orientación, disponibilidad y apoyo constante durante el desarrollo de este trabajo, así como por su confianza y guía a lo largo de este proceso. A todas las personas que han participado en este proyecto y me han ayudado a hacerlo posible, y muy especialmente a Laura, Ada y Ángel, por su implicación, su ayuda constante y, sobre todo, por una paciencia infinita durante todo este proceso.

A Manolo Jiménez, por su apoyo en un momento vital clave, por su guía continuada desde entonces y por el acompañamiento cercano y generoso a lo largo de todo mi recorrido académico y personal.

A Paco Temboursy, por ejercer como un verdadero referente y una figura paterna dentro de la medicina, por su apoyo incondicional y por sus consejos, guía y confianza en todos mis proyectos.

A mi grupo de guardia, y en especial a Bego y Lourdes, por dar tanto cada día y pedir tan poco, y por hacer del trabajo compartido un espacio de apoyo y compañerismo.

Y, por supuesto, a Ana, por darme una familia, por escucharme siempre, por sostenerme en los momentos difíciles y por construir conmigo un hogar lleno de sentido. A ella, a Vega y al futuro miembro de la familia, porque me hacéis ser mejor y me hacéis muy feliz.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice

Glosario de abreviaturas	18
Resumen	26
Introducción	29
Diagnóstico de la DM2	30
Seguimiento de la DM2	31
Mecanismos patogénicos de las complicaciones de la DM2	32
Tratamiento de la DM2	35
Citoquinas como biomarcadores	37
Citoquinas como biomarcador en la DM2	42
Citoquinas en lágrimas en pacientes con DM2	43
Justificación	45
Hipótesis	47
Materiales y métodos	48
<i>Primer estudio: Perfiles Inflamatorios Distintos en Plasma y Lágrimas de Pacientes con Diabetes Tipo 2</i>	
Diseño del estudio y participantes	49
Evaluaciones clínicas	50
Obtención y procesamiento de muestras	51
Determinación de citoquinas	52
Análisis estadístico	53



Segundo estudio: Perfil oftalmológico diferencial en Pacientes con enfermedad coronaria arterial coexistente con Diabetes Mellitus tipo 2: Concentraciones elevadas de citoquinas en lágrimas

Diseño del estudio y participantes	54
Evaluaciones clínicas	55
Evaluación oftalmológica y recolección de muestras de lágrimas	55
Determinación de citoquinas	57
Análisis estadístico	58

Resultados

Primer estudio: Perfiles Inflamatorios Distintos en Plasma y Lágrimas de Pacientes con Diabetes Tipo 2

Características demográficas y clínicas de la muestra	60
Concentraciones de citoquinas	62
Niveles de citoquinas ajustados por edad y factores de riesgo CV	66
Análisis de correlación entre las citoquinas en plasma y lágrimas	71

Segundo estudio: Perfil oftalmológico diferencial en Pacientes con enfermedad coronaria arterial coexistente con Diabetes Mellitus tipo 2: Concentraciones elevadas de citoquinas en lágrimas

Características clínicas de los pacientes con EAC	76
---	----

Parámetros oftalmológicos y concentraciones de citoquinas en lágrimas en pacientes con EAC según la presencia de DM2	80
Correlación entre los parámetros oftalmológicos significativos y las concentraciones de citoquinas en lágrimas en pacientes con EAC	84
Influencia de la edad, el sexo y los factores de riesgo cardiovascular clásicos sobre los parámetros oftalmológicos significativos y las concentraciones de citoquinas en lágrimas en pacientes con EAC según la presencia de DM2	86
Modelos de regresión logística para diferenciar a los pacientes con EAC en función de la coexistencia o no de DM2	91

Discusión

Perfiles Inflamatorios Distintos en Plasma y Lágrimas de Pacientes con Diabetes Tipo 2	98
Evaluación de citoquinas en lágrimas en pacientes con eventos cardiovasculares previos	104

Conclusiones 114

Bibliografía 116

Anexos 120

Aprobación del comité de ética	130
Compromiso del investigador	132
Hoja de información al paciente	133
Consentimiento informado	137

Artículo 1: Perfiles Inflamatorios Distintos en Plasma y Lágrimas de Pacientes con Diabetes Tipo 2 139

Artículo 2: Perfil oftalmológico diferencial en Pacientes con enfermedad coronaria arterial coexistente con Diabetes Mellitus tipo 2: Concentraciones elevadas de citoquinas en lágrimas 141



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Glosario de Abreviaturas

ACV: Accidente cerebrovascular

ADA: Sociedad Americana de Diabetes

AGEs: Productos de glicación interactuando con sus receptores

ANCOVA: Análisis de covarianza

BCVA: Agudeza visual mejor corregida

BGM: Monitoreo de glucosa en sangre

BSA: Albúmina sérica bovina

CCL: Ligandos de la quimiocina CC

CCL2: Ligando de la quimiocina CC 2. También llamada Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1 (MCP-1)

CCL3: Ligando de la quimiocina CC 3. También llamada Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 alfa (MIP-1 α).

CCL4: Ligando de la quimiocina CC 4. También llamada Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 beta (MIP-1 β)

CCL5: Ligando de la quimiocina CC 5. También llamada RANTES (Regulado en Activación, Expresado y Secretado por Linfocitos T Normales)

CCL7: Ligando de la quimiocina CC 5

CCL11: Ligando de la quimiocina CC 11, también llamada eotaxina-1

CCL17: Ligando de la quimiocina CC 17

CCL19: Ligando de la quimiocina CC 19

CCL21: Ligando de la quimiocina CC 21

CCL22: Ligando de la quimiocina CC 22

CCL25: Ligando de la quimiocina CC 25

CXCL : Ligandos de la quimiocina CXC

CXCL1: Ligandos de la quimiocina CXC 1

CXCL2: Ligandos de la quimiocina CXC 2

CXCL5: Ligandos de la quimiocina CXC 1

CXCL8: Ligandos de la quimiocina CXC 8. Es la misma molécula que la interleucina 8

CXCL9: Ligandos de la quimiocina CXC 9

CXCL10: Ligandos de la quimiocina CXC 10

CXCL12: Ligandos de la quimiocina CXC 12

CXCL13: Ligandos de la quimiocina CXC 13

DE: Desviación estándar

DLP: Dislipemia

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

EAC: Enfermedad arterial coronaria

EGF: Factores de crecimiento epidérmico

EGFR: Tasa de filtración glomerular estimada

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

FDR: Tasa de descubrimiento falso

FGF: Factores de crecimiento fibroblástico

GCLMT: grosor mínimo de la capa de células ganglionares

GCLT: Grosor de la capa de células ganglionares

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

GLP-1: Agonistas del receptor del péptido Similar al Glucagón Tipo 1

Hba1C: Hemoglobina glicosilada

HTA: Hipertensión arterial

IAM: Infarto agudo de miocardio

IAMSEST: Infarto agudo de miocardio sin elevación del ST

IC 95%: Intervalo Confianza del 95%

iDPP-4: Inhibidores de la Dipeptidil Peptidasa-4

IFNs: Interferones

IFN- α : Interferón alfa

IFN- β : Interferón beta

IFN- ϵ : Interferón épsilon

IFN- κ : Interferón kappa

IFN- γ : Interferón gamma

IFN- λ 1: Interferón lambda 1

IFN- λ 2: Interferón lambda 2

IFN- λ 3: Interferón lambda 3

IFN- λ 4): Interferón lambda 4

ILs: Interleucinas

IL-1 α : Interleucina 1 α

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-1ra: Antagonista del Receptor de la Interleucina-1

IL-2: Interleucina 2

IL-3: Interleucina 3

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IL-8: Interleucina 8

IL-9: Interleucina 9

IL10: Interleucina 10

IL-11: Interleucina 11

IL-12: Interleucina 12

IL-13: Interleucina 13

IL-15: Interleucina 15

IL-17: Interleucina 17

IL-18: Interleucina 18

IL-19: Interleucina 19

IL-20: Interleucina 20

IL-21: Interleucina 21

IL-22: Interleucina 22

IL-23: Interleucina 23

IL-24: Interleucina 24

IL-27: Interleucina 27

IMC: Índice de masa corporal

IOP: Presión intraocular

iSGLT2: Inhibidores del Cotransportador Sodio-Glucosa Tipo 2

IQR: Intervalo intercuantílico

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MCG: Monitoreo continuo de glucosa

MCV: Volumen del cubo macular

MMT: Grosor macular medio

NGF: Factores de crecimiento nervioso.

NO: Óxido Nítrico

OCT: Tomografía de coherencia óptica

OD: Densidad óptica

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PCR: Proteína C Reactiva

PDGF: Factores de crecimiento plaquetario

PKC: Proteinquinasa C

PPAR- γ : Receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas

RAGE: Receptores de Productos de glicación interactuando con sus receptores

RHO: Coeficiente de correlación de Spearman

RNFLT: Grosor de la capa de fibras nerviosas retinianas

SCF: Factor de célula madre

TGF: Factores de crecimiento transformante.

TNFs: Factores de necrosis tumoral

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNF- β : Factor de Necrosis Tumoral beta (también llamada linfotoxina α)

VEGF: Factores de crecimiento endotelial vascular



RESUMEN

Antecedentes: La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica crónica asociada con inflamación sistémica y un alto riesgo de complicaciones cardiovasculares, incluida la enfermedad arterial coronaria (EAC). El papel de las citoquinas como biomarcadores de inflamación ha cobrado un creciente interés, especialmente en fluidos biológicos alternativos como las lágrimas, que proporcionan un método no invasivo para evaluar y monitorizar la inflamación a nivel local.

Objetivo: El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar los perfiles de citoquinas en lágrimas en pacientes con DM2 con el fin de determinar si estas moléculas pueden ser útiles para diferenciar perfiles inflamatorios en pacientes con enfermedad cardiometabólica.

Métodos: Se realizaron dos estudios observacionales independientes. El primero analizó el perfil de citoquinas en lágrimas y plasma de pacientes con DM2 en comparación con controles no diabéticos, con el fin de evaluar la respuesta inflamatoria sistémica y localizada. El segundo estudio se centró en pacientes con EAC, comparando aquellos con y sin DM2 para identificar perfiles distintivos de citoquinas en lágrimas asociados con la enfermedad cardiometabólica.

Resultados: El primer estudio reveló un aumento significativo de citoquinas inflamatorias en lágrimas (IL-6, CXCL8, IL-15, CCL5, VEGF) en pacientes con DM2, mientras que los marcadores inflamatorios sistémicos estaban relativamente reducidos, sin correlación entre las citoquinas en plasma y en lágrimas. El segundo estudio identificó alteraciones oftalmológicas distintivas (MCV, MMT, RNFLT, GCLT) y un incremento en los niveles de citoquinas en lágrimas (IL-5, G-CSF y CCL11) en pacientes con EAC y DM2. Los modelos de regresión logística demostraron que estas citoquinas en lágrimas podrían discriminar eficazmente entre pacientes con EAC con y sin DM2, de manera independiente a los factores de riesgo cardiovascular clásicos.

Conclusión: Se observó que los pacientes con DM2 presentan niveles reducidos de ciertas citoquinas en plasma, mientras que las concentraciones en lágrimas estaban significativamente elevadas, sin encontrarse correlación entre ambos fluidos, lo que sugiere que la inflamación ocular y sistémica pueden seguir mecanismos independientes. En pacientes con EAC y DM2, se identificó un perfil inflamatorio diferenciado con niveles aumentados de múltiples citoquinas en lágrimas, además de alteraciones en parámetros oftalmológicos, lo que podría indicar afectación ocular en fases iniciales. Además, se encontraron correlaciones inversas entre las citoquinas inflamatorias y parámetros estructurales de la retina, sugiriendo una posible contribución de la inflamación local al deterioro ocular. Modelos de regresión logística identificaron a IL-5, G-CSF y CCL11/eotaxina-1 como biomarcadores con capacidad discriminativa para diferenciar a los pacientes con DM2 en el contexto de la EAC, lo que refuerza el potencial de las citoquinas

en lágrimas como herramienta no invasiva para la evaluación del estado inflamatorio y la estratificación de riesgo en estos pacientes.

Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica crónica, estimándose que afecta a 828 millones de adultos en todo el mundo en 2024, con una prevalencia global de aproximadamente 14 por ciento entre los adultos [1]. La DM2 representa aproximadamente el 98 por ciento de los diagnósticos mundiales de diabetes, aunque esta proporción varía ampliamente entre los países [2]. Su patogénesis sólo se entiende parcialmente, pero es heterogénea. Originalmente se atribuían las alteraciones del metabolismo de glucosa únicamente a la alteración de la insulina, sin embargo, actualmente se conoce que el metabolismo de la glucosa es mucho más complejo, involucrando al sistema inmunológico de forma muy importante [3]. Esta enfermedad se caracteriza por una combinación de resistencia a la insulina y disfunción de las células β pancreáticas, lo que resulta en hiperglucemia crónica y un estado proinflamatorio de bajo grado [4,5].

Su prevalencia se ha incrementado significativamente debido a factores como el envejecimiento de la población, la obesidad y estilos de vida sedentarios [6,7]. Además, debido al marcado aumento de la obesidad infantil, existe la preocupación de que la prevalencia siga aumentando sustancialmente. Los datos mundiales parecen corroborar esta preocupación, ya que los casos aumentaron un 39 por ciento de 1990 a 2019 a nivel mundial [8].

La patogénesis es multifactorial [9], donde se suele dar una combinación de diversos grados de resistencia a la insulina —que es atribuido a factores ambientales como el sedentarismo y la obesidad— y secreción de insulina defectuosa (disfunción de las células beta) —que está

más relacionada con la genética—. Debido a estos dos factores, se produce una mayor demanda de acción de insulina mediada por una resistencia que no va acompañada de secreción de insulina [10].

DIAGNÓSTICO DE LA DM2

La mayoría de los pacientes son asintomáticos en su presentación, observándose una hiperglucemia en una analítica de sangre de rutina, lo que provoca la solicitud de nuevas pruebas si son necesarias. La frecuencia de la diabetes sintomática al diagnóstico ha ido disminuyendo paralelamente a la mejora de los esfuerzos para realizar el diagnóstico a través del cribado [11]. Los síntomas clásicos de hiperglucemia (poliuria, polidipsia, nocturia, visión borrosa y pérdida de peso) se observan a menudo a retrospectiva, después de que se haya demostrado que un valor de glucosa en sangre ha sido elevado. Es muy raro que el debut de una DM2 sea con un estado hiperosmolar hiperglucémico o una cetoacidosis diabética — más infrecuente el primero—, pero puede ser consecuencia de otra patología concomitante que la desencadena, como una situación de estrés grave debido a una infección o a otra enfermedad aguda.

Según la Sociedad Americana de Diabetes (ADA), los criterios para el diagnóstico de DM2 son [12]:

1. Hemoglobina glicada (HbA1C) $\geq 6,5\%$. La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método que esté certificado y estandarizado al ensayo DCCT [13]:

2. Glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dL (7 mmol/l). El ayuno se define como una ingesta calórica durante al menos 8 horas.
3. Glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) dos horas después de una prueba de tolerancia oral a la glucosa. La prueba debe realizarse según lo describió la Organización Mundial de la Salud, utilizando una carga de glucosa equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.
4. En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, una glucosa plasmática aleatoria ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L).

SEGUIMIENTO DE LA DM2

Una vez realizado el diagnóstico, el seguimiento se realiza a través de la HbA1C, al menos dos veces al año en pacientes que cumplen objetivos glucémicos, y con más frecuencia (trimestral) en pacientes cuya terapia ha cambiado o que no están cumpliendo objetivos [13]. El monitoreo de la glucosa en sangre (BGM) no es necesario para la mayoría de los pacientes con DM2 que están en un régimen estable de dieta o antidiabéticos orales y que no están experimentando hipoglucemia. Sin embargo, sí es útil el BGM para los pacientes con DM2 que utilizan los resultados de estas pruebas para modificar los patrones de alimentación y de ejercicio, o están en tratamiento con fármacos hipoglucemiantes, donde se incluye la insulina. Para estos pacientes, las personas en tratamiento con insulina, se cuenta actualmente con el monitoreo continuo de glucosa (MCG), ya que su uso está especialmente justificado en

individuos con hipoglucemia frecuente o alteración de la conciencia de hipoglucemia [14,15].

Por lo tanto, es la HbA1c el parámetro más importante para el diagnóstico y seguimiento de la DM2. Este parámetro mide exactamente cuál ha sido el nivel de glucemia medio durante los últimos 2 a 3 meses. Esto nos indica que es un parámetro muy eficaz para valorar el control de glucemias, pero no se tiene en cuenta la inflamación que genera la enfermedad.

MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS COMPLICACIONES DE LA DM2

La inflamación crónica desempeña un papel central en la patogénesis de la DM2 y sus complicaciones microvasculares y macrovasculares, que representan la principal causa de morbimortalidad en los pacientes con DM2.

Complicaciones macrovasculares

Las complicaciones macrovasculares incluyen la enfermedad arterial coronaria, el accidente cerebrovascular y la enfermedad arterial periférica, derivadas de la **aterosclerosis** acelerada.

Entre los principales mecanismos patogénicos se encuentran:

1. Disfunción endotelial:

- La hiperglucemia crónica induce a un estrés oxidativo, disminuyendo esto la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) y favoreciendo un estado proinflamatorio y protrombótico [16,17].

- La resistencia a la insulina promueve la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) que facilitan la adhesión de monocitos al endotelio, contribuyendo a la formación de placas ateroscleróticas [18].

2. *Inflamación crónica de bajo grado:*

- La activación del sistema inmunitario innato, mediada por citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6), incrementa la actividad de los macrófagos en las placas arteriales [19,20]. Esto produce un estado inflamatorio que está perpetuando el daño vascular, favoreciendo la progresión de la aterosclerosis [21].

3. *Estrés oxidativo:*

- Los productos de glicación avanzada (AGEs) se acumulan en la pared vascular, interactuando con sus receptores (RAGE) para activar vías inflamatorias y prooxidantes. Este proceso exacerba el daño endotelial y la rigidez arterial [22].

4. *Estado procoagulante:*

- La hiperglucemia y la inflamación aumentan la expresión de factores procoagulantes como el fibrinógeno y el factor de von Willebrand, reduciendo la actividad fibrinolítica y favoreciendo, por lo tanto, la formación de trombos [23].

Complicaciones Microvasculares

Éstas son las que afectan a los pequeños vasos, e incluyen a la nefropatía, la neuropatía y la retinopatía diabética. Los principales mecanismos patogénicos que están produciendo estas complicaciones son:

1. Hiperglucemia crónica:

- Activa la vía de los polioles, generando estrés oxidativo y alteraciones en la permeabilidad vascular [24].
- Incrementa la actividad de la proteínquinasa C (PKC), promoviendo vasoconstricción y alteración de la función endotelial [25].

2. Inflamación local:

- Las citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e Interleucina 1 β (IL-1 β), inducen daño vascular en los capilares renales, retinianos y nerviosos [26]. Estas citoquinas también median el engrosamiento de la membrana basal capilar y la proliferación de células mesangiales [27].

3. Isquemia tisular:

- La reducción del flujo sanguíneo capilar en tejidos específicos contribuye a la hipoxia crónica, agravando el daño microvascular y promoviendo la liberación de mediadores inflamatorios [28].

4. Alteraciones metabólicas:

- La acumulación de AGEs en la matriz extracelular interfiere con la reparación tisular y aumenta la rigidez capilar [29].

TRATAMIENTO DE LA DM2

Debido al carácter multifactorial que presenta esta enfermedad, es necesario un abordaje integral para su manejo. El objetivo principal del tratamiento es lograr un buen control glucémico para prevenir las complicaciones macro y microvasculares que acabamos de comentar, mejorando esto la calidad de vida de los pacientes [30].

El tratamiento de esta enfermedad incluye medidas farmacológicas y no farmacológicas. Dentro de las medidas no farmacológicas hay que resaltar los cambios en el estilo de vida, mejorando la dieta hacia una dieta equilibrada y aumentar el ejercicio físico, ya que el sedentarismo es un factor de riesgo muy importante. Además, es necesario controlar los factores de riesgo asociados a esta enfermedad, donde las más importantes son la obesidad, la dislipemia y la hipertensión arterial [31].

Sin embargo, estas medidas deben complementarse en la mayoría de los pacientes con terapias farmacológicas para alcanzar los objetivos glucémicos. Los fármacos disponibles actúan a través de diferentes mecanismos para reducir la glucemia, como son la mejora de la sensibilidad a la insulina, la disminución de la producción hepática de glucosa o el aumento de la secreción de insulina [5].

A continuación, se va a hacer un repaso de los principales grupos de antidiabéticos, su mecanismo de acción y como afectan al proceso inflamatorio de la enfermedad:

- Las **biguanidas (metformina)** disminuyen la producción hepática de glucosa y mejora la sensibilidad periférica a la insulina. Se ha observado que reduce marcadores

inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR) y citoquinas proinflamatorias, produciendo una disminución del estado inflamatorio en pacientes con DM2 [32].

- Los **inhibidores del Cotransportador Sodio-Glucosa Tipo 2 (iSGLT2)** Bloquean la reabsorción de glucosa en el túbulo renal proximal, aumentando su excreción urinaria y reduciendo la glucemia. Con estos fármacos se ha observado que disminuyen marcadores inflamatorios y pueden mejorar el perfil inflamatorio en pacientes con DM2 [33].
- Los agonistas del receptor del **péptido Similar al Glucagón Tipo 1 (GLP-1)** actúan estimulando a secreción de insulina de manera glucosa-dependiente, inhiben la liberación de glucagón y retrasan el vaciamiento gástrico. Se ha demostrado que los GLP-1 mejoran la función mitocondrial de los leucocitos, reducen la producción de especies reactivas de oxígeno y disminuyen interacciones leucocito-endotelio, lo que conlleva una reducción de citoquinas [34].
- Las **sulfonilureas** son fármacos que estimulan la secreción de insulina por las células β pancreáticas de manera independiente de la glucosa. Este grupo de fármacos no se ha demostrado que produzcan disminución de la actividad inflamatoria [35]. Sin embargo, no es un fármaco de primera elección debido a las hipoglucemias y su ausencia de efectos beneficiosos como la disminución de peso.
- Los **inhibidores de la Dipeptidil Peptidasa-4 (iDPP-4)** prolongan la acción de las incretinas endógenas, aumentando la secreción de insulina y disminuyendo la liberación de glucagón. Estos fármacos sí se ha observado que reducen marcadores inflamatorios [36].
- Las **Tiazolidinedionas (Glitazonas)** mejoran la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos al activar el receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas

(PPAR- γ). Este grupo de fármacos han demostrado beneficios cardiovasculares y reducción de marcadores inflamatorios [37].

CITOQUINAS COMO BIOMARCADORES

Las citoquinas son una amplia familia de pequeñas proteínas producidas por diversas células del sistema inmunitario, como macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas. Estas moléculas actúan como mediadores de la comunicación intercelular, regulando procesos inflamatorios, inmunitarios y metabólicos [38]. El uso de citoquinas como biomarcadores está cobrando relevancia en distintas patologías, ya que son capaces de reflejar la actividad inflamatoria y, por lo tanto, valorar la progresión de enfermedades. El uso de las distintas citoquinas nos está permitiendo realizar una monitorización de la actividad de la enfermedad, predecir resultados y evaluar la eficacia de los tratamientos administrados [39].

Las citoquinas se dividen en varias familias principales según su estructura y función:

1. Interleucinas (ILs): Regulan la comunicación entre leucocitos y modulan la respuesta inmune e inflamatoria.

- **Proinflamatorias:** Interleucina 1 α (**IL-1 α**), Interleucina 1 β (**IL-1 β**), Interleucina 6 (**IL-6**), Interleucina 8 (**IL-8**), Interleucina 12 (**IL-12**), Interleucina 17 (**IL-17**), Interleucina 18 (**IL-18**), Interleucina 23 (**IL-23**).

- **Antiinflamatorias:** Interleucina 4 (**IL-4**), Interleucina 10 (**IL-10**), Interleucina 11 (**IL-11**), Interleucina 13 (**IL-13**), Interleucina 19 (**IL-19**), Interleucina 20 (**IL-20**), Interleucina 22 (**IL-22**), Interleucina 24 (**IL-24**), Interleucina 27 (**IL-27**).

- **Reguladoras del desarrollo hematopoyético:** Interleucina 2 (**IL-2**), Interleucina 3 (**IL-3**), Interleucina 5 (**IL-5**), Interleucina 7 (**IL-7**), Interleucina 9 (**IL-9**), Interleucina 15 (**IL-15**), Interleucina 21 (**IL-21**).

2. Quimiocinas: Dirigen el tráfico de células inmunitarias a los sitios de inflamación e infección.

- **Ligandos de la quimiocina CC (CCL):** Ligandos de la quimiocina CC 2 (**CCL2**, **MCP-1**), Ligandos de la quimiocina CC 3 (**CCL3**, **MIP-1 α**), Ligandos de la quimiocina CC 4 (**CCL4**, **MIP-1 β**), Ligandos de la quimiocina CC 5 (**CCL5**, **RANTES**), Ligandos de la quimiocina CC 7 (**CCL7**), Ligandos de la quimiocina CC 11 (**CCL11**, **eotaxina-1**), Ligandos de la quimiocina CC 17 (**CCL17**), Ligandos de la quimiocina CC 19 (**CCL19**), Ligandos de la quimiocina CC 21 (**CCL21**), Ligandos de la quimiocina CC 22 (**CCL22**), Ligandos de la quimiocina CC 25 (**CCL25**).

- **Ligandos de la quimiocina CXC (CXCL):** Ligandos de la quimiocina CXC 1 (**CXCL1**), Ligandos de la quimiocina CXC 2 (**CXCL2**), Ligandos de la quimiocina CXC 5 (**CXCL5**), Ligandos de la quimiocina CXC 8 (**CXCL8**, **IL-8**), Ligandos de la quimiocina CXC 9 (**CXCL9**), Ligandos de la quimiocina CXC 10 (**CXCL10**), Ligandos de la quimiocina

CXC 12 (CXCL12), Ligandos de la quimiocina CXC 13 (CXCL13).

3. Interferones (IFNs): Defienden contra infecciones virales y regulan la respuesta inmune.

- **Tipo I:** Interferón alfa (IFN- α), I Interferón beta (IFN- β), Interferón épsilon (IFN- ϵ), Interferón kappa (IFN- κ).

- **Tipo II:** Interferón gamma (IFN- γ).

- **Tipo III:** Interferón lambda 1 (IFN- λ 1), Interferón lambda 2 (IFN- λ 2), Interferón lambda 3 (IFN- λ 3), Interferón lambda 4 (IFN- λ 4).

4. Factores de Necrosis Tumoral (TNFs): Modulan la inflamación, la apoptosis y la inmunidad.

- Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), factor de Necrosis Tumoral beta (TNF- β , también llamada linfotoxina α).

5. Factores de Crecimiento: Participan en la reparación tisular, angiogénesis y diferenciación celular.

- Factores de crecimiento hematopoyético: Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), Factor de célula madre (SCF).

- Factores de crecimiento endotelial vascular (**VEGF**), factores de crecimiento fibroblástico (**FGF**), factores de crecimiento epidérmico (**EGF**), factores de crecimiento transformante (**TGF**), factores de crecimiento plaquetario (**PDGF**), factores de crecimiento nervioso (**NGF**).

Teniendo esto en cuenta, las citoquinas han ido ganando relevancia como biomarcadores debido a que nos pueden reflejar el estado inflamatorio, inmunológico y metabólico de un organismo. Su medición en distintos fluidos corporales nos permite realizar un diagnóstico temprano, identificando las enfermedades inflamatorias antes de la aparición de los síntomas clínicos [40]; evaluar la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento [33], y también como pronóstico, ya que ayuda a determinar la severidad de las enfermedades y predecir resultados clínicos [41,42]. Algunas enfermedades en las cuales las citoquinas se usan como biomarcadores son:

- **Enfermedades Cardiovasculares**, donde se ha objetivado que niveles elevados de IL6 se asocian a un mayor número de eventos de enfermedad coronaria [43]. También se ha asociado TNF- α , ya que contribuye a la disfunción endotelial promoviendo a procesos aterogénicos [44].
- **Procesos cancerígenos**. En estas enfermedades se está en continuo estudio de biomarcadores, dependiendo del origen tumoral. Un ejemplo es que la IL-10 se encuentra implicada en la supresión de la respuesta inmune, facilitando la evasión tumoral en el cáncer de mama y otros tumores sólidos [45].

- **Enfermedades autoinmunes.** Las citoquinas son proteínas esenciales en la regulación de la respuesta inmunitaria, desempeñando un papel crucial en la patogénesis de estas enfermedades. Estas moléculas median la comunicación entre células inmunitarias, modulando procesos inflamatorios que, cuando se desregulan, pueden conducir a respuestas autoinmunes patológicas. Por ejemplo, citoquinas proinflamatorias como TNF- α y la IL-6 están elevadas en diversas enfermedades autoinmunes, contribuyendo a la inflamación crónica y al daño tisular [46].

La comprensión de la función de las citoquinas ha permitido el desarrollo de terapias dirigidas que buscan modular su actividad para tratar enfermedades autoinmunes. Inhibidores específicos de citoquinas, como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra TNF- α o IL-6, han demostrado eficacia en la reducción de la inflamación y la progresión de enfermedades como la artritis reumatoide [47]. Este enfoque terapéutico resalta la importancia de las citoquinas no solo en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, sino también como objetivos clave para intervenciones clínicas efectivas.

- **Enfermedades neurológicas.** Se han identificado distintas citoquinas en enfermedades neurodegenerativas como la demencia tipo Alzheimer, donde contribuyen al daño neuronal [48].
- **Enfermedades infecciosas.** Las citoquinas no son solo indicadores del estado inmunológico durante las infecciones, sino que también son objetivos terapéuticos en situaciones clínicas como la sepsis, donde la modulación de la respuesta inflamatoria puede mejorar los resultados clínicos. El IFN- γ es clave en la defensa contra infecciones virales y micobacterianas [49], mientras que la IL-1 β participa en la

inflamación asociada a infecciones bacterianas, y niveles elevados de éstas pueden indicar una respuesta inflamatoria desregulada [50]. La IL-6 se correlaciona con la gravedad de infecciones como la infección por SARSCOV2 y la sepsis, y se puede utilizar como factor predictor [51].

CITOQUINAS COMO BIOMARCADOR EN LA DM2

La inflamación crónica de bajo grado que se produce en los pacientes con DM2 desempeña un papel fundamental en su patogénesis. Este proceso inflamatorio está mediado por la secreción anormal de citoquinas proinflamatorias y una disminución de mediadores antiinflamatorios, contribuyendo tanto a la resistencia a la insulina como al desarrollo de complicaciones microvasculares y macrovasculares [44]. Es por esto que el desequilibrio entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias está estrechamente relacionado con la progresión de la enfermedad y sus complicaciones [52].

Entre las citoquinas más relevantes en el desarrollo de la DM2 se encuentran:

- **TNF- α :** Promueve la resistencia a la insulina al interferir con las vías de señalización del receptor de insulina, además de contribuir a la disfunción endotelial y al desarrollo de aterosclerosis [53].
- **IL-6:** Está implicada en la resistencia a la insulina y la progresión de complicaciones cardiovasculares [54]. Además se encuentra muy asociada con inflamación sistémica.

- **IL-1 β** : En la DM2 se produce una sobreexpresión que induce daño a las células β pancreáticas, reduciendo la secreción de insulina y agravando el deterioro metabólico [55].

En los últimos años, las citoquinas han emergido como biomarcadores potenciales para la detección y el monitoreo de la DM2. Su medición en diversos fluidos corporales permite evaluar el estado inflamatorio tanto sistémico como localizado [56,57]. En particular, estudios recientes han destacado la relevancia de medir citoquinas inflamatorias en las lágrimas, ya que ofrecen información única sobre la inflamación local en patologías relacionadas, como la retinopatía diabética [58].

CITOQUINAS EN LÁGRIMAS EN PACIENTES CON DM2.

El análisis de citoquinas en lágrimas está siendo utilizado como una posible herramienta de enfermedades inflamatorias que tienen afectación ocular. Este fluido biológico, accesible de manera no invasiva, ofrece una ventana única para estudiar la inflamación localizada en enfermedades como el síndrome del ojo seco [59] o el queratocono [60]. A lo largo del presente trabajo, los términos inflamación local, inflamación ocular e inflamación lagrimal se emplearán de forma homogénea para referirse a los procesos inflamatorios detectados a nivel de la película lagrimal, con el fin de facilitar la comprensión y evitar ambigüedades terminológicas. Asimismo, se ha valorado el uso de citoquinas como posibles biomarcadores inflamatorios en pacientes con cardiopatía isquémica [61].

En el caso de la DM2, es necesario un adecuado control oftalmológico para prevenir complicaciones y evaluar la evolución de la enfermedad, lo que justifica la realización periódica de fondos de ojo para el cribado [62]. Aunque se han realizado estudios sobre citoquinas en lágrimas en el contexto de complicaciones oculares, como la retinopatía diabética [63,64], persiste una brecha en la literatura respecto a la correlación entre inflamación sistémica y local. La ausencia de estudios que comparen directamente los niveles de citoquinas en lágrimas y suero en pacientes con DM2 representa una oportunidad para avanzar en la comprensión de la actividad inflamatoria a nivel sistémico y a nivel de un órgano diana.

Este enfoque integrador podría permitir la identificación de perfiles inflamatorios específicos, mejorar la estratificación del riesgo y orientar el desarrollo de intervenciones terapéuticas más personalizadas.

Justificación

La DM2 constituye una enfermedad metabólica crónica con alta prevalencia a nivel mundial, caracterizada por complicaciones sistémicas que afectan órganos clave, incluyendo el sistema cardiovascular y el ocular. Estas complicaciones se asocian a procesos inflamatorios crónicos de bajo grado, que han sido ampliamente estudiados en relación con la resistencia a la insulina y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La búsqueda de biomarcadores fiables para evaluar y monitorizar la inflamación asociada a la DM2 es, por tanto, una prioridad en la investigación biomédica actual.

Tradicionalmente, los estudios se han centrado en la evaluación de citoquinas en plasma como indicadores del estado inflamatorio sistémico. Sin embargo, la utilización de muestras de sangre presenta limitaciones como su carácter invasivo y la necesidad de condiciones clínicas estrictas para su obtención. En este contexto, las lágrimas han emergido como una alternativa prometedora debido a su obtención no invasiva y a la posibilidad de reflejar inflamación local en el entorno ocular, un órgano que se ve afectado de manera temprana en la DM2.

La inflamación local y sistémica desempeña un papel crucial en la progresión de la DM2 y sus complicaciones. Las citoquinas, como mediadores inflamatorios, pueden proporcionar información relevante sobre el estado de la enfermedad y su control metabólico. El estudio de estas moléculas en lágrimas ofrece la posibilidad de desarrollar herramientas diagnósticas no invasivas y de bajo coste que podrían complementar las estrategias actuales para el manejo de la DM2.

Desde una perspectiva clínica, la posibilidad de utilizar citoquinas en lágrimas como herramienta diagnóstica y pronóstica representa una innovación que podría transformar la manera en que se aborda el seguimiento y la estratificación del riesgo en pacientes con DM2. Además, su potencial para predecir lesiones cardiovasculares podría mejorar la capacidad de identificar pacientes en riesgo y optimizar la toma de decisiones terapéuticas. Sin embargo, aún existe un vacío en el conocimiento sobre la correlación entre las citoquinas locales en lágrimas y los perfiles inflamatorios sistémicos, así como sobre su aplicabilidad en la práctica clínica.

La justificación de este trabajo radica en la necesidad de explorar nuevas herramientas para la monitorización de la inflamación en la DM2, utilizando enfoques innovadores que permitan una evaluación más precisa y menos invasiva. Esta investigación se plantea como una contribución significativa al campo de la diabetes y la inflamación, con el potencial de impactar positivamente en la calidad de vida de los pacientes y en la eficiencia de los sistemas de salud.

Hipótesis

- **Citoquinas en lágrimas como herramienta de monitorización:** Las citoquinas presentes en lágrimas pueden utilizarse como biomarcadores para monitorizar la inflamación en pacientes con DM2.
- **Comparación de citoquinas en lágrimas y sangre:** Las concentraciones de citoquinas en lágrimas reflejan perfiles inflamatorios locales de la DM2 en comparación con la actividad inflamatoria sistémica de la enfermedad.
- **Predicción de eventos cardiovasculares:** Los perfiles de citoquinas en lágrimas permiten identificar pacientes con mayor riesgo de lesiones cardiovasculares.

Materiales y Métodos

Este trabajo se compone de dos estudios independientes, diseñados para investigar la utilidad de las citoquinas en lágrimas como biomarcadores en el contexto de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). A continuación, se describen los métodos de cada uno de los estudios.

Primer estudio: Perfiles Inflamatorios Distintos en Plasma y Lágrimas de Pacientes con Diabetes Tipo 2

- **Diseño del estudio y participantes**

Para alcanzar los objetivos propuestos, se diseñó un estudio observacional y transversal con un total de 108 participantes, que tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión, resultó en una muestra final de 81 pacientes, distribuidos en los siguientes grupos:

- **Grupo DM2:** 40 pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 (DM2).
- **Grupo Control:** 41 controles no diabéticos.

Todos los participantes fueron reclutados en centros de salud de la provincia de Málaga, entre los meses de mayo y junio de 2023, cumpliendo una serie de criterios de participación:

Criterios de inclusión:

Requerían la participación de hombres y mujeres de 18 años o más que otorgaran su consentimiento informado de manera voluntaria. Para el grupo DM2, los participantes fueron seleccionados de una lista de pacientes en un centro de medicina familiar mediante un muestreo sistemático no aleatorio (se seleccionaba a cada cuarto paciente con DM2; si un paciente no cumplía con los criterios de inclusión, se elegía al siguiente de la lista) para minimizar el sesgo de selección. Los pacientes de este grupo tenían un diagnóstico de DM2 desde hace más de dos años y estaban recibiendo tratamiento médico. El grupo control

incluyó a participantes no diabéticos seleccionados de la misma lista, siguiendo criterios de muestreo idénticos.

Criterios de exclusión:

Pacientes que no podían acudir al centro de salud; que presentaban diagnóstico o sospecha de enfermedad infecciosa activa en el momento del reclutamiento; con diagnóstico previo de retinopatía diabética; con enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo enfermedades autoinmunes; mujeres en estado de embarazo y/o lactancia; aquellos bajo terapia hormonal de cualquier tipo; y aquellos con un estado cognitivo que impidiera la correcta comprensión de la descripción y finalidad del estudio.

- **Evaluaciones clínicas**

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron citados en una consulta de Atención Primaria, en horarios comprendidos entre las 16:00 y 19:00 horas. La evaluación fue realizada por un equipo sanitario consistente en dos médicos y una enfermera, quienes se encargaron de atender a todos los participantes. Durante la entrevista clínica, se confirmaron y recolectaron los datos sociodemográficos de los pacientes, así como los factores de riesgo cardiovascular, incluyendo antecedentes de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular. Además, se evaluaron los criterios de participación y, tras la firma del consentimiento informado, se procedió a la obtención de las muestras biológicas.

- **Obtención y procesamiento de muestras**

Lágrimas:

Las muestras de lágrimas se recolectaron de ambos ojos de cada paciente durante la misma sesión de consulta en la que se realizó la evaluación clínica y la toma de sangre, utilizando la prueba de Schirmer con tiras Schirmer-Plus® (GECIS, Neung sur Beuvron, Francia). Las tiras de papel se colocaron en el fondo inferior de cada ojo sin aplicar anestésico tópico previamente. Se excluyeron aquellas muestras que presentaron menos de 6 mm de humedad en la tira después de 5 minutos. Las muestras de lágrimas se congelaron inmediatamente a -80 °C hasta su análisis, tal como se reportó previamente [65].

Para la elución de proteínas, cada tira con líquido lagrimal se cortó en pequeños fragmentos y se sumergió en 100 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0,3% de Tween® 20, 0,5% de albúmina sérica bovina (BSA) y un inhibidor de proteasas. La mezcla se incubó durante la noche a 4 °C, tras lo cual se recolectó el sobrenadante. El contenido total de proteínas en cada muestra se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ One (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) mediante la medición de la absorbancia a 280 nm.

Plasma:

Las muestras de sangre se recolectaron por la mañana después de que los participantes hubieran ayunado durante 8–12 horas. Se extrajo sangre venosa en tubos de 10 mL con K2 EDTA (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) y se procesó inmediatamente para obtener plasma. Específicamente, las muestras se centrifugaron a 2200 ×g durante 15 minutos a 4 °C, y posteriormente se recolectó el sobrenadante (plasma). Las muestras de plasma fueron caracterizadas individualmente, registradas y almacenadas a –80 °C hasta su posterior análisis.

- **Determinación de citoquinas**

Las concentraciones de mediadores inflamatorios en las muestras de plasma y lágrimas se cuantificaron siguiendo el protocolo provisto por el kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay (#M500KCAF0Y; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Este inmunoensayo, basado en la tecnología Luminex® MAGPIX®, se llevó a cabo en el Laboratorio de la Plataforma IBIMA-BIONAND del Parque Tecnológico de Málaga en colaboración con la Universidad de Málaga. Se analizaron un total de 27 mediadores inflamatorios: interleucina IL1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8 (IL-8), IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, CCL11 (eotaxina-1), FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL10, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), PDGF-BB, CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) y VEGF. Las placas de 96 pocillos se leyeron utilizando un lector Bio-Plex MAGPIX™ y el software Bio-Plex Manager™ MP (Luminex, Austin, TX, USA) en la Unidad de Proteómica de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga.

Todas las muestras se analizaron por duplicado para aumentar la fiabilidad y exactitud de las mediciones y minimizar el sesgo de medición basado en determinaciones previas. Para las muestras con una densidad óptica (OD) inferior al límite de detección en el ensayo multiplex, pero superior al fondo (valores cero), se asignó la concentración a partir de la muestra con la OD más baja, asignándole la mitad de la concentración mínima que pudiera interpolarse en las curvas estándar (64,65). El coeficiente de variabilidad intraensayo fue inferior al 7% y el interensayo inferior al 8%. Las concentraciones de estos mediadores inflamatorios se midieron en pg/mL o ng/mL.

- **Análisis estadístico**

Los datos se presentaron como número y porcentaje de eventos [n (%)], media y desviación estándar (media \pm DE) o mediana e intervalo intercuartílico [mediana (IQR, 25%-75%)], según el tipo y la distribución de la variable.

La significación estadística de las diferencias en variables categóricas se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher, mientras que las diferencias en variables continuas se evaluaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney para variables con distribución no normal o la prueba t de Student para variables con distribución normal. Para controlar la tasa de descubrimiento falso (FDR) derivada de las comparaciones múltiples entre los grupos DM2 y control, se aplicó el procedimiento de Benjamini-Hochberg para calcular los valores p ajustados (q-valores).

Se realizaron múltiples análisis de correlación entre las concentraciones de citocinas en plasma y lágrimas utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). Las concentraciones de citocinas en lágrimas para cada paciente se calcularon como la media

de ambos ojos, con un coeficiente de variación medio inferior al 6%. Se empleó análisis de covarianza (ANCOVA) (estadístico F) para evaluar las citocinas en plasma y lágrimas en función del diagnóstico de DM2, ajustando por variables independientes y covariables para minimizar el sesgo. Los datos brutos de las concentraciones de citocinas se transformaron inversamente para aproximar una distribución normal y cumplir con los supuestos del ANCOVA. Se reportaron las medias marginales estimadas y los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) de las concentraciones de citocinas transformadas inversamente.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e IBM SPSS Statistics versión 22 (IBM, Armonk, NY, USA). Se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0,05.

Segundo estudio: Perfil oftalmológico diferencial en Pacientes con enfermedad coronaria arterial coexistente con Diabetes Mellitus tipo 2: Concentraciones elevadas de citoquinas en lágrimas

- **Diseño del estudio y participantes**

Este estudio transversal y unicéntrico se llevó a cabo en los departamentos de Cardiología y Oftalmología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga, España). Se incluyó a pacientes consecutivos atendidos en el hospital entre febrero y julio de 2022 por sospecha de enfermedad arterial coronaria (EAC) crónica o aguda.

Un total de 125 pacientes con sospecha de EAC fueron inicialmente evaluados. Tras la revisión de sus historias clínicas y la aplicación de criterios de inclusión y exclusión, 100 pacientes cumplieron con los criterios de elegibilidad. Estos pacientes fueron categorizados en dos grupos según la coexistencia de DM2:

- **Grupo EAC+DM2:** 32 pacientes con EAC confirmada y diagnóstico de DM2.
- **Grupo EAC:** 40 pacientes con EAC confirmada y sin diagnóstico de DM2.

Criterios de inclusión:

- Participación voluntaria con firma de consentimiento informado.
- Diagnóstico confirmado de EAC mediante angiografía coronaria o tomografía computarizada.
- Pacientes mayores de 18 años y clínicamente estables.

Criterios de exclusión:

- Enfermedades inflamatorias o infecciosas crónicas.
- Enfermedades oftalmológicas significativas como retinopatía diabética, degeneración macular o oclusiones venosas.
- Enfermedades crónicas avanzadas que reduzcan la esperanza de vida a menos de un año.
- Tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) <30 mL/min/1.73 m².

- **Evaluaciones clínicas**

Los datos clínicos y demográficos se recolectaron mediante historias electrónicas y evaluaciones médicas durante la hospitalización. Se documentaron factores de riesgo cardiovascular como hipertensión, dislipidemia, tabaquismo y obesidad, así como características específicas de EAC, incluidos los tratamientos aplicados (intervenciones coronarias percutáneas o cirugía de bypass coronario).

- **Evaluación oftalmológica y recolección de muestras de lágrimas**

La evaluación oftalmológica se realizó entre las 24 horas previas al alta hospitalaria y los 7 días posteriores al diagnóstico de EAC. Las mediciones incluyeron:

- Agudeza visual mejor corregida (BCVA).
- Presión intraocular (IOP).

- Pruebas de imagen con tomografía de coherencia óptica (OCT), evaluando parámetros como grosor macular, volumen del cubo macular y grosor de la capa de fibras nerviosas retinianas.

Las lágrimas se recolectaron utilizando tiras Schirmer-Plus®, siguiendo un protocolo idéntico al descrito en el primer estudio.

- **Determinación de citoquinas**

La determinación de las concentraciones de mediadores inflamatorios en muestras de plasma y lágrima se realizó siguiendo las instrucciones de Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Este inmunoensayo está basado en la tecnología Luminex® MAGPIX® y se realizó en el laboratorio de IBIMA-Plataforma BIONAND del Parque Tecnológico de Málaga en colaboración con la Universidad de Málaga. Se analizaron un total de 27 mediadores inflamatorios: interleucina IL1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8 (IL-8), IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, CCL11 (eotaxina-1), FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL10, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), PDGF-BB, CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) y VEGF.

- **Análisis estadístico**

Las citoquinas en lágrimas se analizaron mediante el mismo kit multiplex utilizado en el primer estudio (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay).

Las diferencias entre grupos se analizaron mediante pruebas t de Student o Mann-Whitney para variables continuas y chi-cuadrado para variables categóricas.

Se utilizaron modelos de regresión logística para evaluar la capacidad predictiva de las citoquinas en lágrimas respecto a complicaciones cardiovasculares.

Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos, ajustándose mediante el procedimiento de Benjamini-Hochberg.

Resultados

Primer estudio: Perfiles Inflamatorios Distintos en Plasma y Lágrimas de Pacientes con Diabetes Tipo 2

1. Características Demográficas y Clínicas de la Muestra

La muestra total (n = 81) presentó una distribución equilibrada entre mujeres (49%) y hombres (51%), con una mediana de edad de 64 años y un índice de masa corporal (IMC) mediano de 28,7 kg/m². Los participantes presentaron sobrepeso de forma predominante (53%) y una alta prevalencia de hipertensión (HTA) (67%) y dislipidemia (DLP) (53%), pero una baja proporción de fumadores (16%).

La comparación entre los grupos DM2 y control reveló diferencias significativas en edad ($p < 0,01$), HTA ($p < 0,001$) y DLP ($p < 0,01$). El grupo DM2 presentó una mediana de edad más elevada (67 años) y una mayor prevalencia de HTA (88%) y DLP (75%) en comparación con el grupo control. Cabe destacar que todos los casos de infarto agudo de miocardio (IAM) (13%) y accidente cerebrovascular (ACV) (8%) en la muestra se observaron en pacientes con DM2, sin que se reportaran casos en el grupo control.

Además, los pacientes con DM2 controlada tenían un nivel mediano de HbA1C de 6,4%, significativamente superior al del grupo control ($p < 0,001$).

Table 1.

VARIABLE		GROUP			P-value
		Total	Control	T2DM	
		n = 81	n = 41	n = 40	
Sex [n (%)]	Female	41 (50.6)	24 (58.5)	17 (42.5)	0.149 ^a
	Male	40 (49.4)	17 (41.5)	13 (57.5)	
Age (years)	Mean ± SD	64.1 ± 9.5	60.9 ± 9.4	67.3 ± 8.5	0.002 ^b
BMI (kg/m ²)	Median (IQR)	28.7 (6.0)	27.9 (6.3)	29.0 (6.2)	0.158 ^c
Obesity ^d [n (%)]	Normal	9 (11.1)	6 (14.6)	3 (7.5)	0.691 ^c
	Overweight	43 (53.1)	22 (53.7)	21 (52.5)	
	Class I	19 (23.5)	4 (9.8)	10 (25.0)	
	Class II	10 (12.3)	4 (9.8)	6 (15.0)	
	Class III	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Hypertension [n (%)]		54 (66.7)	19 (46.3)	35 (87.5)	<0.001 ^a
Dyslipidemia [n (%)]		43 (53.1)	15 (36.6)	28 (70.0)	0.003 ^a
Smoking [n (%)]		13 (16.0)	8 (19.5)	5 (12.5)	0.390 ^a
Acute myocardial infarction [n (%)]		5 (6.2)	0 (0.0)	5 (12.5)	0.019 ^a
Ischemic stroke [n (%)]		3 (3.7)	0 (0.0)	3 (7.5)	0.074 ^a
Glycated hemoglobin (%)	Median (IQR)	5.9 (1.0)	5.7 (0.4)	6.4 (1.1)	<0.001 ^c

(^a) P-value calculated using the chi-square test; (^b) P-value calculated using the Student t test; (^c) P-value calculated using the Mann-Whitney U test; (^d) Obesity was categorized according to BMI (kg/m²) into normal (< 18.5), overweight (18.5-24.9), obesity class I (30.0-34.9), obesity class II (35.0-39.9), and obesity class III (≥ 40.0). Abbreviations: BMI = body mass index; IQR = interquartile range; SD = standard deviation.

2. Concentraciones de Citocinas

Se determinaron las concentraciones de mediadores inflamatorios a partir de las muestras de plasma y lágrimas de los participantes para investigar las diferencias entre los grupos DM2 y control utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

Concentraciones en Plasma

Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en solo cuatro analitos (Tabla 2). Específicamente, los pacientes con DM2 mostraron una disminución significativa en las concentraciones de IL-9 ($U = 389$, $p < 0,001$) y CCL4 ($U = 774,5$, $p < 0,001$) en comparación con los participantes control. Por el contrario, se observó un aumento significativo en las concentraciones de CCL11 ($U = 1081,5$, $p < 0,05$) y VEGF ($U = 1058,5$, $p < 0,05$). Sin embargo, tras el ajuste por comparaciones múltiples, solo **IL-9** y **CCL4** se mantuvieron significativos.

Tabla 2. Concentraciones en Plasma

VARIABLE		GRUPO		P-valor ^a
		Control	DM2	
		n = 41	n = 40	
IL-1 β (pg/mL)	Mediana (RIC)	7.40 (11.36)	10.25 (7.79)	0.443
IL-1ra (ng/mL)	Mediana (RIC)	1.37 (0.59)	1.34 (0.40)	0.288

IL-2 (pg/mL)	Mediana (RIC)	18.31 (7.76)	14.43 (7.74)	0.068
IL-4 (pg/mL)	Mediana (RIC)	21.57 (10.86)	22.14 (13.37)	0.653
IL-5 (pg/mL)	Mediana (RIC)	190.5 (168.9)	269.9 (153.9)	0.078
IL-6 (pg/mL)	Mediana (RIC)	8.97 (9.88)	11.17 (8.24)	0.631
IL-7 (pg/mL)	Mediana (RIC)	55.93 (36.41)	34.98 (41.76)	0.053
CXCL8 (pg/mL)	Mediana (RIC)	23.62 (12.63)	25.22 (11.97)	0.636
IL-9 (ng/mL)	Mediana (RIC)	3.18 (0.66)	2.88 (0.60)	<0.001
IL-10 (pg/mL)	Mediana (RIC)	14.68 (10.76)	14.68 (10.76)	0.357
IL-12p70 (pg/mL)	Mediana (RIC)	35.57 (17.57)	35.57 (17.57)	0.527
IL-13 (pg/mL)	Mediana (RIC)	13.49 (8,17)	11.43 (11.3)	0.185
IL-15 (pg/mL)	Mediana (RIC)	903.4 (276.0)	903.4 (276.0)	0.566
IL-17 (pg/mL)	Mediana (RIC)	30.17 (16.95)	24.52 (16.25)	0.779
CCL11 (pg/mL)	Mediana (RIC)	426.6 (219.0)	572.2 (349.0)	0.014
FGF basic (pg/mL)	Mediana (RIC)	114.52 (38.04)	95.29 (19.23)	0.095
G-CSF (pg/mL)	Mediana (RIC)	128.2 (125.6)	143.9 (125.6)	0.621
GM-CSF (pg/mL)	Mediana (RIC)	12.95 (7.30)	13.61 (5.28)	0.060
IFN-γ (pg/mL)	Mediana (RIC)	41.48 (22.05)	41.48 (19.84)	0.801
CXCL10 (ng/mL)	Mediana (RIC)	1.73 (1.07)	1.47 (1.04)	0.117
CCL2 (pg/mL)	Mediana (RIC)	108.76 (80.39)	118.57 (52.68)	0.107
CCL3 (pg/mL)	Mediana (RIC)	7.12 (3.24)	6.19 (3.44)	0.665
PDGF-BB (ng/mL)	Mediana (RIC)	1.02 (1.19)	0.73 (0.87)	0.098

CCL4 (ng/mL)	Mediana (RIC)	1.43 (0.23)	1.24 (0.37)	<0.001
CCL5 (ng/mL)	Mediana (RIC)	12.9 (4.97)	13.93 (6.37)	0.865
TNF-α (ng/mL)	Mediana (RIC)	154.73 (51.44)	154.73 (51.54)	0.422
VEGF (ng/mL)	Mediana (RIC)	303.7 (180.1)	423.4 (223.4)	0.024

(*) *P*-valor calculada usando el test U the Mann-Whitney. Las diferencias significativas después del ajuste por comparaciones múltiples (FDR) están indicadas en negrita (nivel de significación corregido por Benjamini-Hochberg $q = 0.0037$).

Concentraciones en Lágrimas

El análisis de las concentraciones de citocinas en las lágrimas de ambos ojos reveló diferencias significativas entre los dos grupos en varios analitos.

Table 3. Concentración de citoquinas en lágrimas

VARIABLE		GROUP		<i>P</i> -valor ^a
		Control	T2DM	
		n = 82	n = 80	
IL-1β (pg/mL)	Mediana (RIC)	1.09 (0.68)	1.26 (0.87)	0.173
IL-1ra (ng/mL)	Mediana (RIC)	5.87 (5.56)	8.66 (6.66)	0.001
IL-2 (pg/mL)	Mediana (RIC)	0.77 (0.68)	0.87 (0.51)	0.267
IL-4 (pg/mL)	Mediana (RIC)	4.95 (4.21)	5.44 (5.18)	0.380
IL-5 (pg/mL)	Mediana (RIC)	51.43 (37.34)	47.03 (43.12)	0.696

IL-6 (pg/mL)	Mediana (RIC)	1.19 (2,46)	2.57 (4.29)	<0.001
IL-7 (pg/mL)	Mediana (RIC)	6.99 (4.09)	6.91 (4.88)	0.444
CXCL8 (pg/mL)	Mediana (RIC)	20.41 (36.21)	45.61 (98.52)	<0.001
IL-9 (ng/mL)	Mediana (RIC)	11.35 (6.36)	11.09 (7.87)	0.461
IL-10 (pg/mL)	Mediana (RIC)	1.25 (1.07)	1.18 (1.39)	0.515
IL-12p70 (pg/mL)	Mediana (RIC)	1.60 (1.88)	1.51 (1.64)	0.943
IL-13 (pg/mL)	Mediana (RIC)	0.24 (0.39)	0.24 (0.58)	0.377
IL-15 (pg/mL)	Mediana (RIC)	45.52 (54.67)	70.69 (58.64)	0.001
IL-17 (pg/mL)	Mediana (RIC)	2.45 (1.58)	2.40 (2.36)	0.903
CCL11 (pg/mL)	Mediana (RIC)	2.03 (1.51)	2.29 (2.01)	0.472
FGF basic (pg/mL)	Mediana (RIC)	4.04 (1.89)	3.95 (2.33)	0.752
G-CSF (pg/mL)	Mediana (RIC)	4.56 (8.66)	7.16 (17.76)	0.014
GM-CSF (pg/mL)	Mediana (RIC)	0.55 (0.53)	0.66 (0.74)	0.307
IFN-γ (pg/mL)	Mediana (RIC)	211.4 (251.8)	198.3 (239.4)	0.563
CXCL10 (ng/mL)	Mediana (RIC)	2.83 (2.07)	3.03 (3.28)	0.133
CCL2 (pg/mL)	Mediana (RIC)	9.40 (9.19)	12.37 (16.69)	0.002
CCL3 (pg/mL)	Mediana (RIC)	0.23 (0.15)	0.25 (0.31)	0.063
PDGF-BB (ng/mL)	Mediana (RIC)	1.42 (2.43)	2.26 (1.97)	0.053
CCL4 (ng/mL)	Mediana (RIC)	4.78 (2.86)	4.49 (3.66)	0.435
CCL5 (ng/mL)	Mediana (RIC)	1.06 (1.76)	1.98 (1.94)	<0.001
TNF-α (ng/mL)	Mediana (RIC)	13.78 (11.44)	15.2 (14.34)	0.433

VEGF (ng/mL)	Mediana (RIC)	11.08 (14.04)	15.34 (21.44)	0.001
---------------------	---------------	---------------	---------------	--------------

(^a) p valor calculado mediante la prueba de Mann-Whitney U. Las diferencias significativas después del ajuste por comparaciones múltiples (FDR) están indicadas en negrita (nivel de significación corregido por Benjamini-Hochberg $q = 0.0148$). Las medianas se calcularon utilizando las concentraciones de citoquinas en lágrimas de ambos ojos.

A diferencia de los hallazgos en plasma, las citocinas alteradas en los pacientes con DM2 se encontraban elevadas en comparación con los controles. Las comparaciones entre los grupos revelaron incrementos significativos en las concentraciones en lágrimas de **IL-1ra** (U = 4293, $p = 0,001$), **IL-6** (U = 4387,5, $p < 0,001$), **CXCL8** (U = 4476, $p < 0,001$), **IL-15** (U = 4292,5, $p = 0,001$), **G-CSF** (U = 4014, $p < 0,05$), **CCL2** (U = 4223, $p < 0,01$), **CCL5** (U = 4653,5, $p < 0,001$) y **VEGF** (U = 4258,5, $p = 0,001$). Tras el ajuste por comparaciones múltiples, todas las diferencias significativas se mantuvieron.

3. Niveles de Citocinas Ajustados por Edad y Factores de Riesgo Cardiovascular

Las concentraciones de citocinas en muestras de plasma y lágrimas (de ambos ojos) se analizaron mediante ANCOVA, considerando el diagnóstico de DM2 como factor principal y la edad, hipertensión y dislipidemia como covariables. Dada la distribución de las concentraciones de los analitos, los valores se transformaron inversamente para cumplir los supuestos de este procedimiento estadístico paramétrico.

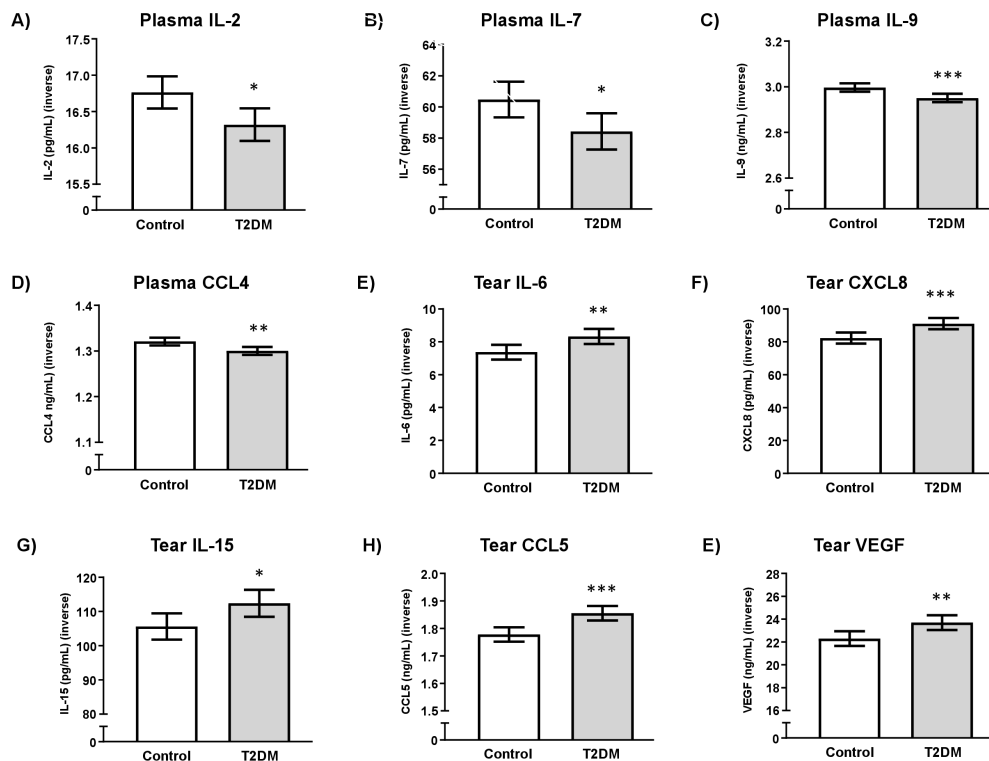
- Niveles en Plasma

El análisis de los niveles de citocinas en plasma reveló un efecto principal significativo del diagnóstico de DM2 sobre IL-2 ($F(1,81) = 6,83$, $p = 0,011$; Fig. 1A), IL-7 ($F(1,81) = 5,49$, $p = 0,022$; Fig. 1B), IL-9 ($F(1,81) = 11,17$, $p = 0,001$; Fig. 1C) y CCL4 ($F(1,81) = 9,66$, $p = 0,003$; Fig. 1D). En todos los casos, el diagnóstico de DM2 se asoció con una disminución significativa en los niveles de estas citocinas en los pacientes con DM2 en comparación con los controles.

- Niveles en Lágrimas

En cuanto a los niveles de citocinas en lágrimas (de ambos ojos), el análisis reveló un efecto principal significativo del diagnóstico de DM2 sobre IL-6 ($F(1,162) = 7,37$, $p = 0,007$; Fig. 1E), CXCL8 ($F(1,162) = 11,32$, $p = 0,001$; Fig. 1F), IL-15 ($F(1,162) = 5,14$, $p = 0,025$; Fig. 1G), CCL5 ($F(1,162) = 14,73$, $p < 0,001$; Fig. 1H) y VEGF ($F(1,162) = 8,11$, $p = 0,005$; Fig. 1E). A diferencia de lo observado en plasma, en los pacientes con DM2 el diagnóstico se asoció con un aumento significativo de estos niveles de citocinas en comparación con los controles.

Figure 1



- Influencia de la Edad y Factores Cardiovasculares en los Niveles de Citocinas

Dado que los análisis estadísticos se realizaron mediante ANCOVA, incluyendo la edad, hipertensión y dislipidemia como covariables, se examinó la influencia de estas covariables en los niveles de citocinas en ambos fluidos. Mientras que la hipertensión y la dislipidemia no mostraron efectos significativos sobre las concentraciones de citocinas transformadas inversamente en plasma o lágrimas, la edad se asoció de forma significativa con alteraciones en varios mediadores inflamatorios, particularmente en las lágrimas.

En plasma, las citocinas cuyos niveles se vieron significativamente afectados por la edad incluyeron IL-1 β (F(1,81) = 7,53, p = 0,008), IL-9 (F(1,81) = 4,83, p = 0,031), CCL11 (F(1,81) = 4,14, p = 0,045), CXCL10 (F(1,81) = 6,98, p = 0,010), CCL3 (F(1,81) = 4,97, p = 0,029) y TNF- α (F(1,81) = 4,29, p = 0,042). Para investigar más a fondo esta asociación con la edad, se realizó un análisis de correlación con las concentraciones brutas de estos analitos. Si bien la mayoría de estas citocinas exhibió una correlación positiva con la edad, IL-9 mostró una correlación inversa significativa ($\rho = -0,35$, p = 0,001).

Tabla S1. Análisis de correlación entre la edad y las concentraciones de citoquinas en muestras de plasma y lágrimas para aquellas citoquinas afectadas por la edad en la ANCOVA, con el diagnóstico de diabetes tipo 2 como factor principal.

VARIABLE	Total			
	Plasma		Lágrimas	
	Age (years)		Age (years)	
	ρ	P-value ^a	ρ	P-value ^a
IL-1 β (pg/mL)	+0.295	0.008	+0.262	0.018
IL-1ra (ng/mL)	-	-	+0.293	0.008
IL-2 (pg/mL)	-	-	+0.182	0.105
IL-4 (pg/mL)	-	-	+0.248	0.026
IL-5 (pg/mL)	-	-	+0.172	0.124
IL-6 (pg/mL)	-	-	+0.408	<0.001
CXCL8 (pg/mL)			+0.387	<0.001
IL-9 (ng/mL)	-0.349	0.001	+0.138	0.218
IL-10 (pg/mL)	-	-	+0.144	0.199
IL-12p70 (pg/mL)	-	-	+0.128	0.256
IL-13 (pg/mL)	-	-	+0.206	0.064
IL-15 (pg/mL)	-	-	+0.381	<0.001
IL-17 (pg/mL)	-	-	+0.194	0.083

CCL11 (pg/mL)	+0.314	0.004	+0.226	0.042
FGF basic (pg/mL)	-	-	+0.187	0.094
G-CSF (pg/mL)	-	-	+0.388	<0.001
GM-CSF (pg/mL)	-	-	+0.243	0.029
CXCL10 (ng/mL)	+0.191	0.088	+0.170	0.129
CCL3 (pg/mL)	+0.217	0.052	+0.240	0.031
PDGF-BB (ng/mL)	-	-	+0.275	0.013
CCL4 (ng/mL)	-	-	+0.351	0.001
CCL5 (ng/mL)	-	-	+0.424	<0.001
TNF- α (ng/mL)	+0.201	0.072	+0.192	0.085
VEGF (ng/mL)	-	-	+0.347	0.001

- (a) p-valor calculado utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Se realizó un ANCOVA unidireccional utilizando el diagnóstico de diabetes tipo 2 como factor principal, y la edad, la hipertensión y la dislipidemia como covariables. En las lágrimas, las correlaciones se calcularon utilizando la concentración media de citoquinas de ambos ojos por participante.

En particular, el análisis de los niveles de citocinas en lágrimas reveló que la mayoría de las citocinas (24 de los 27 estudiados) se vieron significativamente afectadas por la edad. Se observaron asociaciones significativas para IL-1 β (F(1,162) = 8,08, p = 0,005), IL-1ra (F(1,162) = 7,45, p = 0,007), IL-2 (F(1,162) = 6,09, p = 0,015), IL-4 (F(1,162) = 5,34, p = 0,022), IL-5 (F(1,162) = 11,41, p = 0,001), IL-6 (F(1,162) = 19,98, p < 0,001), CXCL8 (F(1,162) = 13,34, p < 0,001), IL-9 (F(1,162) = 6,40, p = 0,012), IL-10 (F(1,162) = 4,11, p = 0,044), IL-12p70 (F(1,162) = 4,84, p = 0,029), IL-13 (F(1,162) = 4,63, p = 0,033), IL-15 (F(1,162) = 15,96, p < 0,001), IL-17 (F(1,162) = 8,19, p = 0,005), CCL11 (F(1,162) = 3,95, p = 0,049), FGF basic (F(1,162) = 5,44, p = 0,021), G-CSF (F(1,162) = 17,08, p < 0,001), GM-CSF (F(1,162) = 6,97, p = 0,009), CXCL10 (F(1,162) = 6,66, p = 0,011), CCL3 (F(1,162) = 8,91, p = 0,003), PDGF-BB (F(1,162) = 11,03, p = 0,001), CCL4

($F(1,162) = 12,91, p < 0,001$), CCL5 ($F(1,162) = 18,12, p < 0,001$), TNF- α ($F(1,162) = 5,96, p = 0,016$) y VEGF ($F(1,162) = 14,21, p < 0,001$). De forma similar a lo observado en plasma, el análisis de correlación utilizando las concentraciones medias de citocinas de ambos ojos por participante reveló una correlación positiva con la edad.

4. Análisis de Correlación entre las Concentraciones de Citocinas en Plasma y Lágrimas

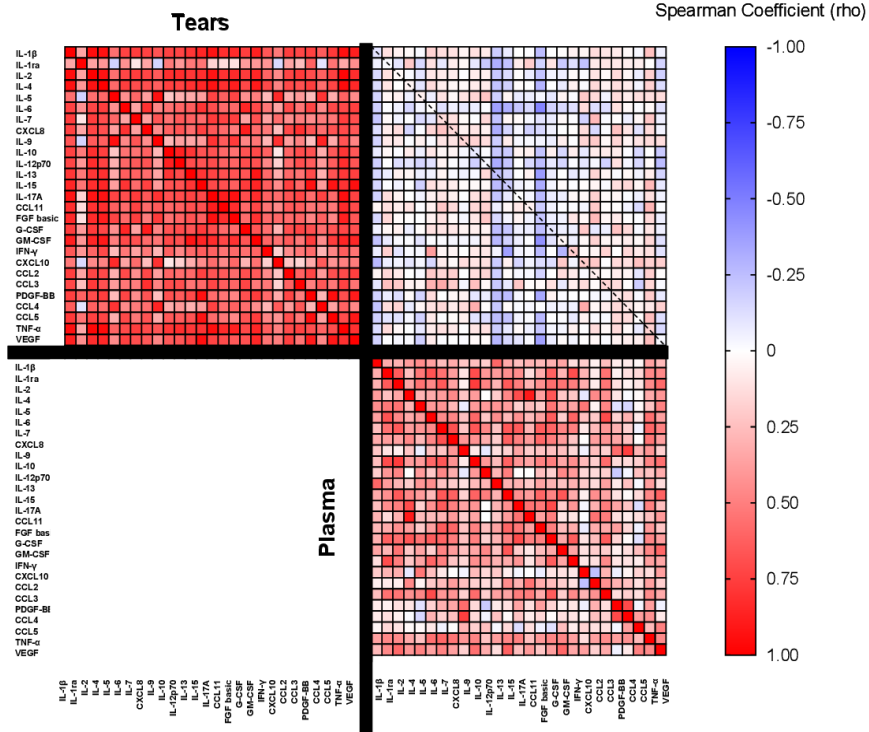
Tras medir las concentraciones de citocinas en muestras de plasma y lágrimas de pacientes con DM2 y controles, se analizaron las correlaciones entre estos mediadores inflamatorios en ambos fluidos, utilizando las concentraciones en plasma y la media de las concentraciones en lágrimas (de ambos ojos) por participante.

En la muestra total, las concentraciones de citocinas en lágrimas mostraron fuertes correlaciones positivas, siendo el 98,4% de ellas estadísticamente significativas, mientras que las citocinas plasmáticas exhibieron correlaciones más débiles, alcanzando la significación en el 66,5% de los casos. Además, solo el 3,6% de las correlaciones entre las concentraciones de citocinas en plasma y lágrimas fueron significativas (Figura 3).

Cuando se analizaron por separado en el grupo control (Figura S1) y en el grupo DM2 (Figura S2), se mantuvo la tendencia de correlaciones más fuertes entre las citocinas en lágrimas en comparación con plasma, al igual que la ausencia de asociación entre las concentraciones de citocinas en ambos fluidos.

Figure S1

A) Control group (rho values)



B) Control group (P-values)

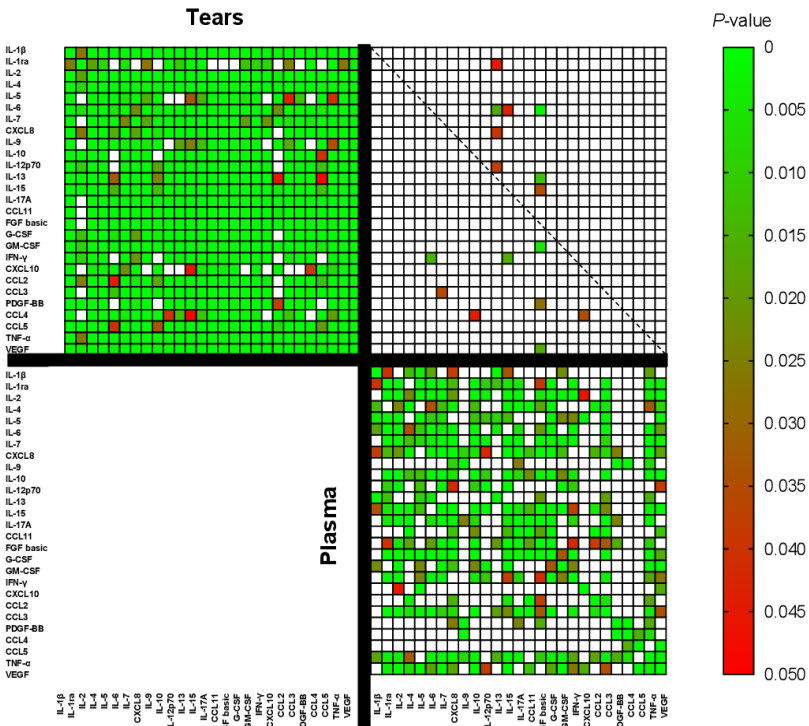
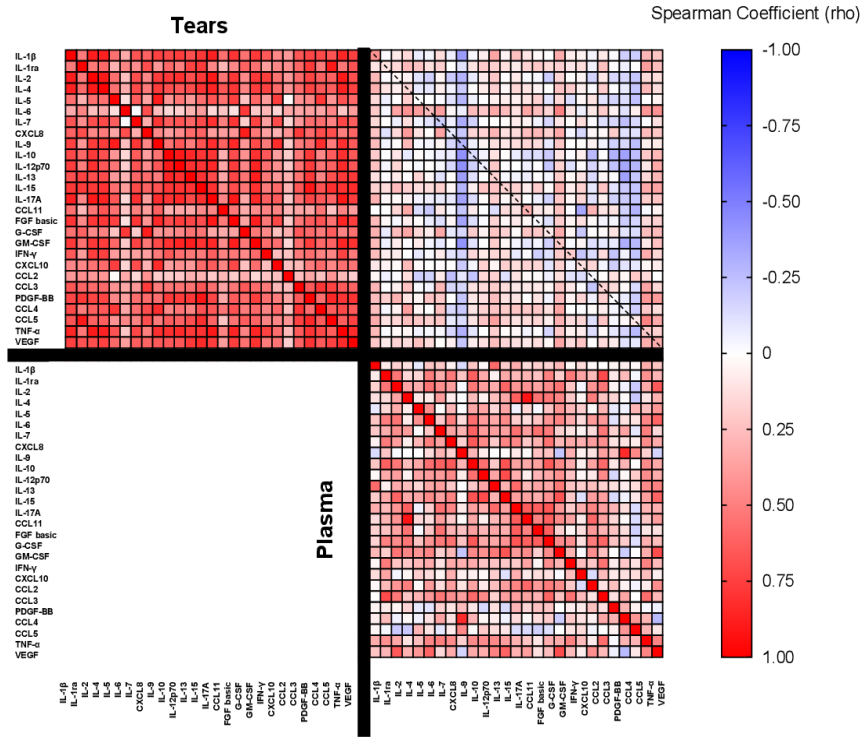
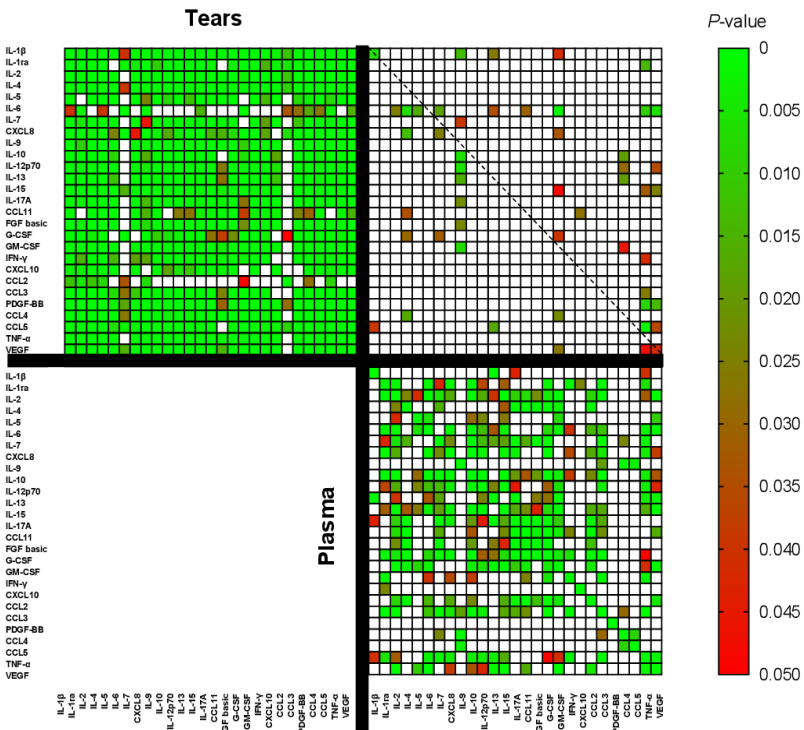


Figure S2

A) T2DM group (rho values)



B) T2DM group (P-values)



Cabe destacar que no se encontraron correlaciones significativas entre el mismo analito inflamatorio medido en plasma y en lágrimas, ni en la muestra total ni en cada grupo por separado. Aunque un análisis inicial sugirió una correlación positiva significativa entre las concentraciones de IL-1 β en plasma y lágrimas en pacientes con DM2, esta asociación no se mantuvo significativa tras el ajuste por comparaciones múltiples.

Tabla S2. Análisis de correlación múltiple entre las concentraciones en plasma y la concentración media en lágrimas de ambos ojos para las mismas citoquinas.

VARIABLE	Total		Control		DM2	
	n = 81		n = 41		n = 40	
	rho	P-value ^a	rho	P-value ^a	Rho	P-value ^a
IL-1 β (pg/mL)	+0.144	0.199	-0.113	0.481	+0.427	0.006
IL-1ra (ng/mL)	+0.016	0.888	+0.018	0.910	+0.112	0.493
IL-2 (pg/mL)	+0.024	0.834	+0.021	0.895	+0.035	0.829
IL-4 (pg/mL)	+0.104	0.356	+0.043	0.791	+0.161	0.322
IL-5 (pg/mL)	+0.003	0.975	+0.058	0.719	+0.001	0.996
IL-6 (pg/mL)	+0.112	0.320	+0.006	0.971	+0.251	0.118
IL-7 (pg/mL)	-0.051	0.625	+0.136	0.398	-0.190	0.240
CXCL8 (pg/mL)	+0.022	0.844	+0.152	0.344	-0.089	0.586
IL-9 (ng/mL)	-0.044	0.694	+0.158	0.323	-0.590	0.070
IL-10 (pg/mL)	-0.111	0.324	-0.081	0.615	-0.141	0.387
IL-12p70 (pg/mL)	-0.054	0.634	-0.033	0.837	-0.069	0.672
IL-13 (pg/mL)	-0.026	0.819	-0.242	0.128	+0.180	0.265
IL-15 (pg/mL)	-0.011	0.920	-0.200	0.209	+0.165	0.309
IL-17 (pg/mL)	+0.057	0.613	-0.002	0.989	+0.111	0.497
CCL11 (pg/mL)	+0.215	0.054	+0.056	0.728	+0.304	0.057
FGF basic (pg/mL)	-0.125	0.265	-0.227	0.154	-0.016	0.920
G-CSF (pg/mL)	-0.037	0.743	-0.091	0.571	+0.086	0.599
GM-CSF (pg/mL)	+0.131	0.245	+0.032	0.845	+0.213	0.187

IFN-γ (pg/mL)	+0.210	0.059	+0.199	0.213	+0.196	0.226
CXCL10 (ng/mL)	+0.116	0.301	+0.202	0.204	+0.129	0.463
CCL2 (pg/mL)	+0.046	0.682	+0.065	0.684	-0.034	0.837
CCL3 (pg/mL)	+0.113	0.315	+0.161	0.314	+0.161	0.320
PDGF-BB (ng/mL)	+0.014	0.902	+0.085	0.599	-0.016	0.923
CCL4 (ng/mL)	-0.024	0.831	+0.085	0.597	-0.047	0.775
CCL5 (ng/mL)	+0.086	0.445	+0.004	0.979	+0.096	0.554
TNF-α (ng/mL)	+0.195	0.081	+0.172	0.282	+0.204	0.207
VEGF (ng/mL)	+0.177	0.114	-0.028	0.863	+0.324	0.041

(a) p valor calculado utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Las correlaciones significativas después del ajuste por pruebas múltiples (FDR) se indican en negrita (nivel de significación corregido por Benjamini-Hochberg $q = 0.0019$).

Segundo estudio: Perfil oftalmológico diferencial en Pacientes con enfermedad coronaria arterial coexistente con Diabetes Mellitus tipo 2: Concentraciones elevadas de citoquinas en lágrimas

1. Características clínicas de los pacientes EAC.

Tras la estabilización clínica, 100 pacientes con sospecha de EAC crónica o aguda cumplieron con los criterios de elegibilidad y fueron clasificados en pacientes con diagnóstico de EAC y pacientes sin diagnóstico de EAC.

Tabla S1. Factores de riesgo cardiovascular de pacientes con sospecha de EAC según la confirmación de EAC.

Variable	Total	No EAC	EAC	Valor P
Participantes (n)	100	28	72	---
Sexo, mujeres [n (%)]	27 (27.0)	9 (32.1)	18 (25.0)	0.412 a
Edad (años) (media \pm DE)	60.3 \pm 9.0	59.3 \pm 9.7	60.7 \pm 8.7	0.467 b
Hábito de fumar [n (%)]	40 (40.0)	8 (28.6)	32 (44.4)	0.176 a
DM2 [n (%)]	43 (43.0)	11 (39.3)	32 (44.4)	0.661 a
Hipercolesterolemia [n (%)]	36 (36.0)	11 (39.3)	25 (34.7)	0.817 a
Obesidad [n (%)]	42 (42.0)	12 (42.9)	30 (41.7)	>0.999 a
EPOC [n (%)]	9 (9.0)	2 (7.1)	7 (9.7)	>0.999 a
Enfermedad renal crónica [n (%)]	5 (6.9)	2 (7.1)	5 (6.9)	>0.999 a
Hipertensión arterial [n (%)]	39 (39.0)	13 (46.43)	36 (50.0)	0.825 a

(a) Valores P utilizando la prueba exacta de Fisher. (b) Valores P utilizando la prueba t de Student.

Abreviaciones: EAC = enfermedad arterial coronaria; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; DE = desviación estándar; DM2 = diabetes mellitus tipo 2.

Los pacientes con sospecha de EAC eran mayoritariamente hombres (73%), con una edad media de 60 años. Setenta y dos pacientes fueron confirmados con EAC tras la evaluación coronaria. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos entre los pacientes con y sin diagnóstico de EAC. Este resultado era esperable, dado que la indicación de angiografía coronaria en nuestro centro se basa en una estimación del riesgo cardiovascular, el cual está determinado principalmente por la presencia de estos factores de riesgo.

Los pacientes diagnosticados con EAC ($n = 72$) fueron categorizados según la presencia o ausencia de DM2, observándose una alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en ambos grupos (Tabla 1):

- 50% de los pacientes presentaban hipertensión.
- 44% eran fumadores.
- 42% eran obesos.
- 35% tenían hipercolesterolemia.

Tabla 1. Características clínicas basales de los pacientes con EAC según la presencia de DM2.

Variable	Total	No DM2	DM2	Valor p
Participantes (n)	72	40	32	---
Sexo, mujeres [n (%)]	18 (25.0)	12 (30.0)	6 (18.8)	0.412 (a)
Edad (años) (media \pm DE)	60.7 \pm 8.7	59.5 \pm 7.9	62.4 \pm 9.2	0.158 (b)
Hábito tabáquico [n (%)]	32 (44.4)	22 (55.0)	10 (31.3)	0.092 (a)
Antecedentes médicos y enfermedades cardiovasculares previas [n (%)]				
Hipercolesterolemia	25 (34.7)	10 (25.0)	15 (46.9)	0.081 (a)
Obesidad	30 (41.7)	15 (37.5)	15 (46.9)	0.476 (a)
EPOC	7 (9.7)	4 (10.0)	3 (9.4)	>0.999 (a)
Enfermedad renal crónica	5 (6.9)	2 (5.0)	3 (9.4)	0.650 (a)
Hipertensión arterial	36 (50.0)	16 (40.0)	20 (62.5)	0.096 (a)
Enfermedad arterial coronaria				
Enfermedad arterial periférica	12 (16.7)	6 (15.0)	6 (18.8)	0.756 (a)
Accidente cerebrovascular/AIT	2 (2.8)	0 (0.0)	2 (6.3)	0.194 (a)
Fibrilación auricular/Arritmia	3 (4.2)	1 (2.5)	2 (6.3)	0.582 (a)
Tipo de EAC [n (%)]				
EAC crónica	24 (33.3)	13 (32.5)	11 (34.4)	0.983 (a)
IAM con elevación del ST (SCACEST)	18 (25.0)	10 (25.0)	8 (25.0)	
IAM sin elevación del ST (SCASEST)	30 (41.7)	17 (42.5)	13 (40.6)	
Gravedad de la EAC [n (%)]				

Lesiones no significativas	18 (25.0)	11 (27.5)	7 (21.9)	0.267 (a)
Enfermedad de un solo vaso	21 (29.2)	14 (35.0)	7 (21.9)	
Enfermedad multivaso	33 (45.8)	15 (37.5)	18 (56.3)	
Parámetros sanguíneos al ingreso (media ± DE) / [mediana (IQR)]				
Albúmina (g/dL)	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.8	3.2 ± 0.4	0.493 (b)
Creatinina (mg/dL)	0.98 (0.78 - 1.18)	1.01 (0.75 - 1.22)	0.96 (0.80 - 1.15)	0.891 (c)
Hemoglobina (g/dL)	13.9 ± 1.7	14.0 ± 2.1	13.6 ± 1.8	0.396 (b)
Proteína C reactiva (mg/L)	16.6 ± 8.5	14.7 ± 8.0	18.0 ± 9.3	0.110 (b)
Filtración glomerular estimada (mL/min/1.73m ²)	78.25 (59.50 - 90.00)	79.00 (65.25 - 90.00)	77.50 (59.00 - 95.00)	0.724 (c)
Tratamiento [n (%)]				
Conservador	23 (31.9)	13 (32.5)	10 (31.3)	>0.999 (a)
ICP/CABG	49 (68.1)	27 (67.5)	22 (68.8)	

(b) Valores p calculados mediante la prueba exacta de Fisher. (b) Valores p calculados mediante la prueba t de Student. (c) Valores p calculados mediante la prueba de Mann-Whitney U.

Abreviaciones: CABG = cirugía de derivación aortocoronaria; EAC = enfermedad arterial coronaria; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IAM = infarto agudo de miocardio; ICP = intervención coronaria percutánea; IQR = rango intercuartílico; SCASEST = infarto agudo de miocardio sin elevación del ST; SCACEST = infarto agudo de miocardio con elevación del ST; TIA = ataque isquémico transitorio; DM2 = diabetes mellitus tipo 2.

Si bien los pacientes con DM2 mostraron una mayor prevalencia de comorbilidades y enfermedades cardiovasculares previas (como hipercolesterolemia, obesidad e hipertensión) en comparación con aquellos sin DM2, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a las características específicas de la EAC, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con y sin DM2 en las diversas variables analizadas en

nuestra muestra. La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados con infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (IAMSEST, 42%) y presentaban enfermedad multivaso.

2. Parámetros oftalmológicos y concentraciones de citoquinas en lágrimas en pacientes con EAC según la presencia de DM2

Los pacientes con EAC fueron clasificados en función de la presencia o ausencia de DM2, y se realizaron evaluaciones oftalmológicas mediante la recopilación de parámetros estructurales oculares y el análisis de muestras de lágrimas. No hubo valores faltantes en los datos recopilados.

Parámetros oftalmológicos

Como se muestra en la Tabla 2, se evaluaron múltiples parámetros oftalmológicos y se observaron algunas diferencias entre los pacientes con EAC y DM2 en comparación con aquellos con EAC sin DM2.

- Aunque los pacientes con EAC y DM2 presentaron una disminución en la prueba de Schirmer, en la agudeza visual mejor corregida (BCVA) y en el grosor mínimo de la capa de células ganglionares (GCLMT), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.
- Sin embargo, los pacientes con EAC y DM2 mostraron valores significativamente más bajos en los siguientes parámetros después del ajuste por comparaciones múltiples:

- Volumen del cubo macular (MCV) ($q < 0,01$).
- Grosor macular medio (MMT) ($q < 0,01$).
- Grosor de la capa de fibras nerviosas retinianas (RNFLT) ($q < 0,05$).
- Grosor de la capa de células ganglionares (GCLT) ($q < 0,05$).

Tabla 2. Parámetros oftalmológicos en pacientes con EAC según la presencia de DM2

Parámetro oftalmológico	EAC sin DM2	EAC con DM2	Valor de p a,b	Valor de p ajustado (q-valor) c
Número de ojos examinados (n)	80	64	---	---
Presión intraocular (mm Hg) (media \pm DE)	15.05 \pm 2.95	14.08 \pm 2.96	0.053 a	ns
AVMC [mediana (RIC)]	1.00 (1.00 - 1.00)	1.00 (0.90 - 1.00)	0.029 b	ns
Test de Schirmer (mm/5 min) [mediana (RIC)]	18.00 (12.00 - 28.75)	13.00 (9.00 - 26.00)	0.043 b	ns
TCCT (μ m) (media \pm DE)	550.55 \pm 37.80	549.94 \pm 38.36	0.925 a	ns
PCCT (μ m) (media \pm DE)	549.06 \pm 42.21	554.02 \pm 36.77	0.475 a	ns
Longitud axial (mm) (media \pm DE)	23.66 \pm 0.91	23.57 \pm 1.57	0.722 a	ns
CMT (μ m) (media \pm DE)	269.08 \pm 28.35	267.18 \pm 28.56	0.696 a	ns
MCV (mm ³) (media \pm DE)	10.32 \pm 0.51	10.02 \pm 0.48	0.001 a	0.008
MMT (μ m) (media \pm DE)	286.51 \pm 14.11	277.93 \pm 13.42	<0.001 a	0.004
RNFLT (μ m) (media \pm DE)	92.65 \pm 10.90	86.51 \pm 12.21	0.002 a	0.012
GCLT (μ m) (media \pm DE)	81.59 \pm 10.46	76.20 \pm 11.74	0.005 a	0.015
GCLMT (μ m) (media \pm DE)	76.11 \pm 17.94	69.62 \pm 16.34	0.037 a	ns
Grosor coroideo (μ m) (media \pm DE)	306.95 \pm 64.73	292.00 \pm 82.28	0.247 a	ns

Notas:

(a) Valores de p calculados mediante la prueba t de Student (con corrección de Welch cuando las varianzas eran desiguales).

- (b) Valores de p calculados mediante la prueba U de Mann-Whitney.
(c) Valores de p ajustados (q-valores) utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg para el control de la tasa de descubrimiento falso (FDR).

Abreviaciones:

AVMC = agudeza visual mejor corregida; EAC = enfermedad arterial coronaria; CMT = grosor macular central; FDR = tasa de descubrimiento falso; GCLMT = grosor mínimo de la capa de células ganglionares; GCLT = grosor de la capa de células ganglionares; RIC = rango intercuartílico; MCV = volumen del cubo macular; MMT = grosor macular medio; ns = no significativo; PCCT = paquimetría del grosor central de la córnea; RNFLT = grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina; DE = desviación estándar; TCCT = topografía del grosor central de la córnea; DM2 = diabetes mellitus tipo 2.

Concentraciones de citoquinas en lágrimas

- Algunas citoquinas no pudieron ser cuantificadas en las muestras de lágrimas debido a que sus concentraciones se encontraban por debajo del límite de detección: IL-2, IL-10, IL-12, IL-15 y VEGF.
- En general, las concentraciones de mediadores inflamatorios en lágrimas fueron más elevadas en pacientes con EAC y DM2 en comparación con aquellos sin DM2 (Tabla 3).
- Específicamente, se observaron aumentos significativos ($q < 0,05$) en las concentraciones de las siguientes citoquinas después del ajuste por comparaciones múltiples:
 - IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β y CCL11/eotaxina-1.
- Por el contrario, las concentraciones de citoquinas proinflamatorias clave como IL-1 β y TNF- α no mostraron diferencias significativas entre los grupos de pacientes con EAC.

Tabla 3. Concentraciones de mediadores inflamatorios en lágrimas de pacientes con EAC según la presencia de DM2.

Mediador inflamatorio	EAC sin DM2 (n=80)	EAC con DM2 (n=64)	Valor de p (a)	Valor de p ajustado (q-valor) (b)
Número de ojos examinados (n)	80	64	---	---
IL-1 β (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.305 (0.200 - 0.400)	0.269 (0.195 - 0.464)	0.842	ns
IL-1ra (ng/mg) [mediana (IQR)]	4.021 (3.102 - 6.076)	4.991 (4.268 - 6.565)	0.003	0.024
IL-4 (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.273 (0.215 - 0.349)	0.364 (0.291 - 0.441)	<0.001	0.017
IL-5 (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.900 (0.200 - 1.845)	3.508 (2.727 - 4.500)	<0.001	0.005
IL-6 (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.818 (0.542 - 1.785)	1.614 (0.665 - 2.549)	0.005	0.026
IL-7 (pg/mg) [mediana (IQR)]	4.795 (3.359 - 5.893)	5.194 (3.456 - 6.888)	0.142	ns
IL-8 (pg/mg) [mediana (IQR)]	32.14 (22.60 - 62.33)	69.62 (41.41 - 120.17)	<0.001	0.012
IL-9 (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.609 (0.020 - 4.208)	3.546 (0.510 - 6.397)	0.001	0.019
IL-13 (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.292 (0.185 - 0.508)	0.404 (0.278 - 0.615)	0.008	0.029
IL-17A (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.300 (0.300 - 0.600)	0.400 (0.300 - 0.600)	0.058	ns
TNF- α (pg/mg) [mediana (IQR)]	2.200 (1.000 - 7.380)	1.500 (1.000 - 2.500)	0.069	ns
G-CSF (pg/mg) [mediana (IQR)]	2.010 (0.073 - 9.893)	14.749 (7.165 - 22.429)	<0.001	0.007
GM-CSF (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.459 (0.150 - 0.886)	0.567 (0.420 - 0.794)	0.011	0.031
IFN- γ (pg/mg) [mediana (IQR)]	52.33 (38.60 - 67.17)	62.93 (56.51 - 72.10)	0.001	0.021
PDGF-BB (pg/mg) [mediana (IQR)]	4.510 (1.510 - 15.150)	5.010 (1.635 - 7.510)	0.127	ns
CCL2/MCP-1 (pg/mg) [mediana (IQR)]	7.381 (3.188 - 19.015)	6.306 (2.979 - 21.156)	0.603	ns
CCL3/MIP-1 α (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.174 (0.128 - 0.338)	0.382 (0.212 - 0.490)	<0.001	0.014
CCL4/MIP-1 β (pg/mg) [mediana (IQR)]	1.488 (0.731 - 2.489)	4.093 (2.404 - 5.660)	<0.001	0.010
CCL5/RANTES (pg/mg) [mediana (IQR)]	24.72 (11.12 - 46.38)	28.70 (20.25 - 49.21)	0.034	ns

Mediador inflamatorio	EAC sin DM2 (n=80)	EAC con DM2 (n=64)	Valor de p (a)	Valor de p ajustado (q-valor) (b)
CCL11/eotaxina-1 (pg/mg) [mediana (IQR)]	0.475 (0.354 - 0.629)	0.685 (0.635 - 0.861)	<0.001	0.002
CXCL10/IP-10 (ng/mg) [mediana (IQR)]	2.249 (1.445 - 3.100)	2.314 (1.771 - 3.501)	0.587	ns

(a) Valores de p calculados mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

(b) Valores de p ajustados (q-valores) mediante el procedimiento de Benjamini-Hochberg para el control de la tasa de descubrimiento falso (FDR).

Abreviaturas:

FDR = tasa de descubrimiento falso; G-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IFN- γ = interferón gamma; IL = interleucina; IP-10 = proteína 10 inducida por interferón gamma; IQR = rango intercuartil; MCP-1 = proteína quimioatrayente de monocitos-1; MIP = proteína inflamatoria de macrófagos; ns = no significativo; PDGF-BB = factor de crecimiento derivado de plaquetas BB; RANTES = proteína regulada y expresada por células T activadas y secretada; DM2 = diabetes mellitus tipo 2.

3. Correlación entre los parámetros oftalmológicos significativos y las concentraciones de citoquinas en lágrimas en pacientes con EAC

Se investigó la posible asociación entre las variables que mostraron diferencias significativas en ambos grupos de pacientes con EAC. Se encontraron correlaciones inversas entre los parámetros oftalmológicos (MCV, MMT, RNFLT y GCLT) y la mayoría de las citoquinas en lágrimas (IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, G-CSF, IFN- γ , CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β y CCL11/eotaxina-1).

Las asociaciones entre los parámetros oftalmológicos y las concentraciones de ciertos mediadores inflamatorios fueron estadísticamente significativas (Figura 1a, 1b):

- IL-5

- MCV ($\rho = -0,18$, $p = 0,032$).
- MMT ($\rho = -0,18$, $p = 0,039$).
- RNFLT ($\rho = -0,29$, $p < 0,001$).
- GCLT ($\rho = -0,28$, $p = 0,001$).
- IL-8
 - MCV ($\rho = -0,21$, $p = 0,011$).
 - MMT ($\rho = -0,22$, $p = 0,009$).
- G-CSF
 - MCV ($\rho = -0,22$, $p = 0,010$).
 - MMT ($\rho = -0,22$, $p = 0,008$).
- CCL3/MIP-1 α
 - RNFLT ($\rho = -0,18$, $p = 0,033$).
- CCL4/MIP-1 β
 - MCV ($\rho = -0,20$, $p = 0,016$).
 - MMT ($\rho = -0,21$, $p = 0,013$).
 - RNFLT ($\rho = -0,17$, $p = 0,043$).
- CCL11/eotaxina-1
 - MCV ($\rho = -0,26$, $p = 0,002$).
 - MMT ($\rho = -0,25$, $p = 0,003$).
 - RNFLT ($\rho = -0,22$, $p = 0,010$).
 - GCLT ($\rho = -0,23$, $p = 0,006$).

Figura 1

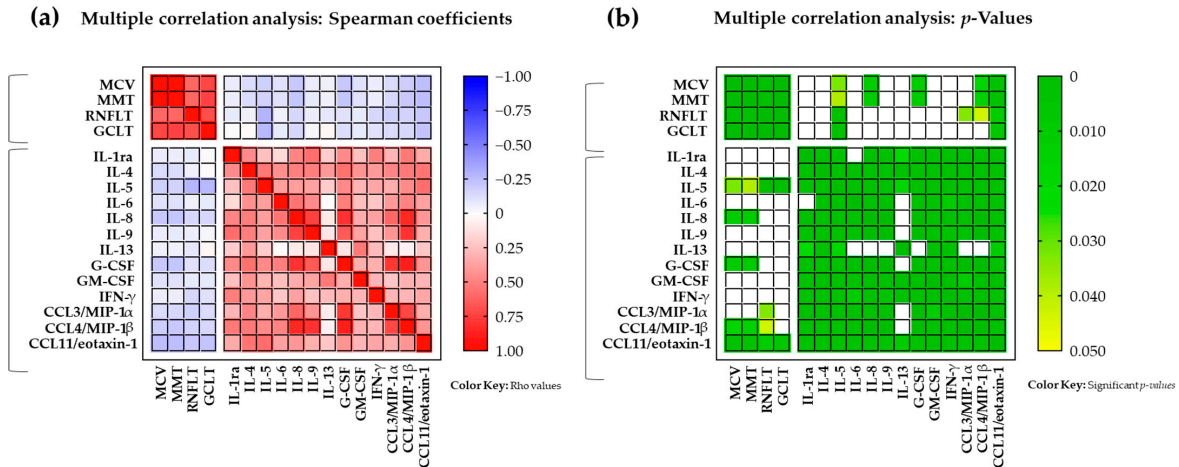


Figura 1. Análisis de correlación múltiple entre parámetros oftalmológicos y citoquinas inflamatorias en lágrimas de pacientes con diagnóstico de EAC. Las variables fueron analizadas utilizando los coeficientes de correlación de Spearman: (a) Los valores de Rho fueron codificados por colores según una escala que varía de azul ($\rho = -1.0$) a rojo ($\rho = +1.0$); y (b) los valores de p significativos también fueron codificados por colores, con una escala de verde ($p < 0.001$) a amarillo ($p < 0.05$). Los parámetros oftalmológicos fueron medidos en los 144 ojos de 72 pacientes con EAC. Las concentraciones de citoquinas en lágrimas fueron medidas por duplicado en cada uno de los 144 ojos. Para el análisis de correlación múltiple se utilizaron determinaciones individuales de los parámetros oftalmológicos y las concentraciones medias de citoquinas ($n = 144$).

Estos resultados sugieren una asociación inversa significativa entre los niveles elevados de ciertas citoquinas en lágrimas y la reducción en parámetros estructurales de la retina, lo que podría indicar un papel relevante de la inflamación en los cambios oftalmológicos observados en pacientes con EAC y DM2.

4. Influencia de la edad, el sexo y los factores de riesgo cardiovascular clásicos sobre los parámetros oftalmológicos significativos y las concentraciones de citoquinas en lágrimas en pacientes con EAC según la presencia de DM2

Dado el posible impacto de variables como sexo, edad y factores de riesgo cardiovascular con alta prevalencia (HTA, DLP, obesidad y tabaquismo) en las diferencias observadas entre

los grupos de pacientes con EAC y DM2, se realizaron análisis de covarianza (ANCOVA) para evaluar los parámetros oftalmológicos y las concentraciones de citoquinas en lágrimas.

Las enfermedades con baja prevalencia en ambos grupos (enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedad renal crónica) fueron excluidas del análisis debido a su presencia en menos del 10% de los pacientes.

Para asegurar el cumplimiento de los supuestos estadísticos requeridos para los análisis paramétricos, los datos de concentración de citoquinas (pg/mL) fueron transformados logarítmicamente. Posteriormente, se realizó una retransformación de los valores marginales estimados en aquellos casos donde se identificaron diferencias significativas entre pacientes con EAC y DM2 y aquellos sin DM2.

Efectos de la comorbilidad con DM2 y otros factores de riesgo cardiovascular en los parámetros oftalmológicos significativos

Con respecto a los parámetros oftalmológicos presentados en la Figura 2 (es decir, MCV, MMT, RNFLT y GCLT), los pacientes con EAC y DM2 comórbida presentaron valores significativamente más bajos de MCV ($F_{1, 132} = 7,62, p = 0,007$; Figura 2a) y MMT ($F_{1, 132} = 8,11, p = 0,005$; Figura 2b) en comparación con los pacientes sin DM2. Sin embargo,

no se observaron diferencias en RNFLT y GCLT entre ambos grupos después de ajustar por edad, sexo y otros factores de riesgo cardiovascular (Figura 2c,d).

Cabe destacar que solo la obesidad mostró un efecto significativo en todos estos parámetros oftalmológicos ($p < 0,01$), a diferencia de otros factores de riesgo.

Figura 2

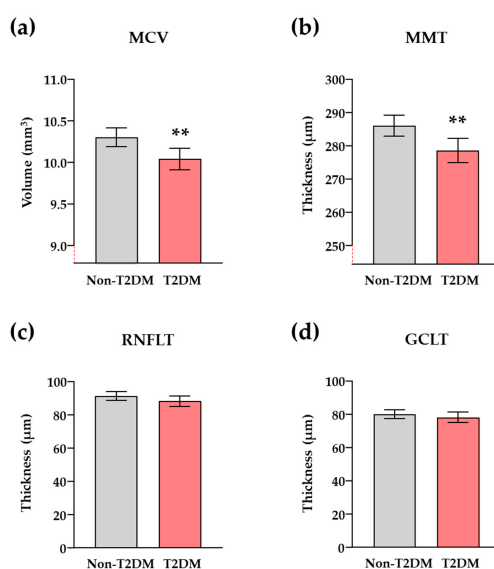


Figura 2. Parámetros oftalmológicos en pacientes con EAC según la coexistencia de DM2, tras ajustar por otros factores de riesgo cardiovascular. (a) Volumen del cubo macular (MCV); (b) Grosor macular medio (MMT); (c) Grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina (RNFLT); y (d) Grosor de la capa de células ganglionares (GCLT). Las barras representan las medias marginales estimadas y el intervalo de confianza del 95% (IC 95%) de las variables dependientes tras el análisis ANCOVA, con la DM2 comórbida como factor principal y la hipertensión, la hipercolesterolemia, la obesidad, el hábito tabáquico, la edad y el sexo como variables independientes. (**) Indica diferencias significativas con $p < 0.01$ en comparación con el grupo sin DM2. Los parámetros oftalmológicos fueron medidos en los 144 ojos de 72 pacientes con EAC ($n = 144$, muestra total; $n = 80$, grupo sin DM2; $n = 64$, grupo con DM2). Cabe destacar que solo la obesidad mostró un efecto significativo en todos estos parámetros oftalmológicos ($p < 0.01$), a diferencia de otros factores de riesgo.

Efectos de la comorbilidad con DM2 y otros factores de riesgo cardiovascular en las concentraciones de citoquinas significativas

Los resultados del ANCOVA revelaron que las concentraciones de IL-1ra e IFN- γ no fueron significativamente influenciadas por la presencia de DM2 en el contexto de otros factores de riesgo cardiovascular. Sin embargo, como se muestra en la Figura 3, los pacientes con EAC y DM2 comórbida presentaron concentraciones significativamente más altas de IL-4 (F1, 136 = 10,54, p = 0,001; Figura 3a), IL-5 (F1, 136 = 26,21, p < 0,001; Figura 3b), IL-6 (F1, 136 = 5,75, p = 0,018; Figura 3c), IL-8 (F1, 136 = 9,52, p = 0,002; Figura 3d), IL-9 (F1, 136 = 7,54, p = 0,007; Figura 3e), IL-13 (F1, 136 = 15,09, p < 0,001; Figura 3f), G-CSF (F1, 136 = 19,06, p < 0,001; Figura 3g), GM-CSF (F1, 136 = 6,65, p = 0,011; Figura 3h), CCL3/MIP-1 α (F1, 136 = 10,81, p = 0,001; Figura 3i), CCL4/MIP-1 β (F1, 136 = 16,85, p < 0,001; Figura 3j) y CCL11/eotaxina-1 (F1, 136 = 28,48, p < 0,001; Figura 3k) en comparación con los pacientes sin DM2.

Figura 3

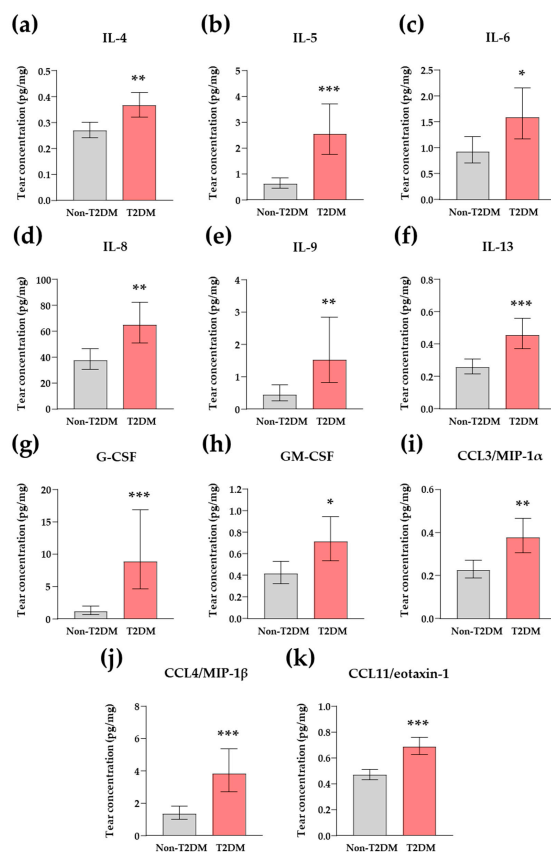


Figura 3. Concentraciones de citoquinas en lágrimas en pacientes con EAC según la coexistencia de DM2, tras ajustar por otros factores de riesgo cardiovascular. (a) IL-4; (b) IL-5; (c) IL-6; (d) IL-8; (e) IL-9; (f) IL-13; (g) G-CSF; (h) GM-CSF; (i) CCL3/MIP-1 α ; (j) CCL4/MIP-1 β ; y (k) CCL11/eotaxina-1. Las barras representan las medias marginales estimadas y el intervalo de confianza del 95% (IC 95%) de las variables dependientes tras el análisis ANCOVA, con la DM2 comórbida como factor principal y la hipertensión, la hipercolesterolemia, la obesidad, el hábito tabáquico, la edad y el sexo como variables independientes. Las concentraciones brutas de citoquinas fueron transformadas logaritmicamente para el análisis y posteriormente retransformadas para su representación. (*, ** y ***) indican diferencias significativas con $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente, en comparación con el grupo sin DM2. Las concentraciones de citoquinas fueron medidas por duplicado en cada uno de los 144 ojos de 72 pacientes con EAC ($n = 144$, muestra total; $n = 80$, grupo sin DM2; $n = 64$, grupo con DM2).

Mientras que el sexo, la HTA y la obesidad no mostraron efectos significativos sobre estas citoquinas inflamatorias, otros factores independientes sí exhibieron efectos significativos: la edad influyó en las concentraciones de IL-8, IL-9, IL-13, G-CSF y CCL4; la

hipercolesterolemia afectó las concentraciones de CCL3; y el hábito de fumar tuvo un impacto significativo en las concentraciones de IFN- γ .

5. Modelos de regresión logística para diferenciar a los pacientes con EAC en función de la coexistencia o no de DM2

Para identificar posibles variables discriminatorias, se realizaron análisis de regresión logística binaria multivariable utilizando parámetros oftalmológicos y concentraciones brutas de citoquinas que exhibieron asociaciones significativas con la presencia de DM2 comórbida, teniendo en cuenta la edad, el sexo y otros factores de riesgo cardiovascular clásicos.

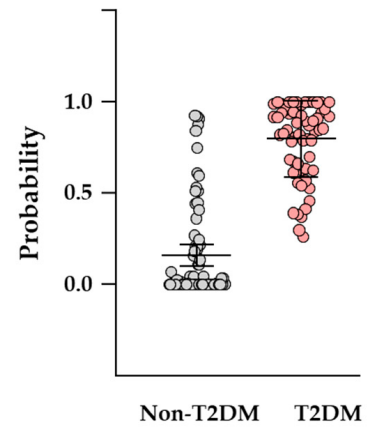
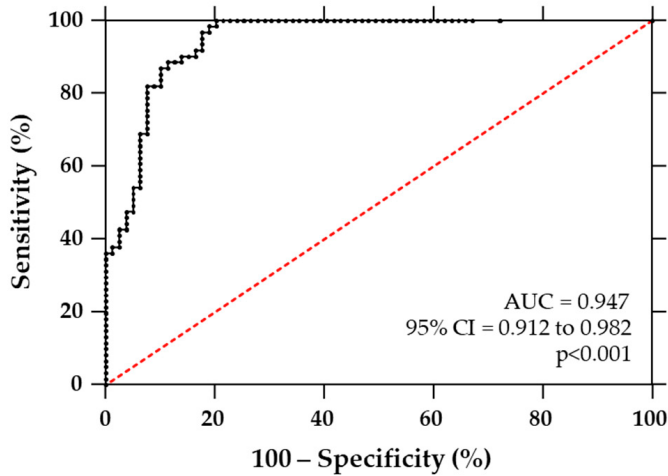
Modelo completo de regresión logística

Se construyó un modelo completo de regresión logística binaria utilizando MCV, MMT y concentraciones de citoquinas en lágrimas de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, G-CSF, GM-CSF, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β y CCL11/eotaxina-1 (Tabla 4). El modelo identificó MCV (mm³ reescalado multiplicado por 100: OR = 1.41; IC 95% = 1.07–1.85; $p < 0.05$), MMT (OR = 0.29; IC 95% = 0.11–0.77; $p < 0.05$), IL-4 (pg/mL reescalado multiplicado por 10: OR = 0.43; IC 95% = 0.20–0.90; $p < 0.05$), IL-5 (OR = 2.09; IC 95% = 1.43–3.05; $p < 0.001$), IL-13 (pg/mL reescalado multiplicado por 10: OR = 1.47; IC 95% = 1.09–1.98; $p < 0.01$), G-CSF (OR = 1.44; IC 95% = 1.18–1.75; $p < 0.001$), CCL4/MIP-1 β

(pg/mL reescalado multiplicado por 10: OR = 0.41; IC 95% = 0.20–0.85; $p < 0.05$) y CCL11/eotaxina-1 (pg/mL reescalado multiplicado por 10: OR = 2.68; IC 95% = 1.61–4.47; $p < 0.001$) como variables distintivas para la presencia de DM2 comórbida en pacientes con EAC. El análisis ROC demostró un alto poder discriminatorio del modelo (AUC = 0.950, IC 95% = 0.914–0.985; $p < 0.001$). Se eligió un valor de corte óptimo de 0.487, lo que resultó en una sensibilidad del 93.4% y una especificidad del 91.1% (Figura 4a).

Figura 4

(a) ROC for full logistic regression model



(b) ROC for reduced logistic regression model

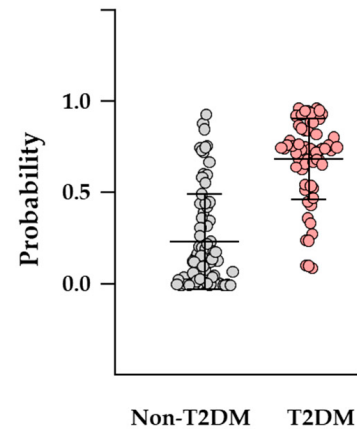
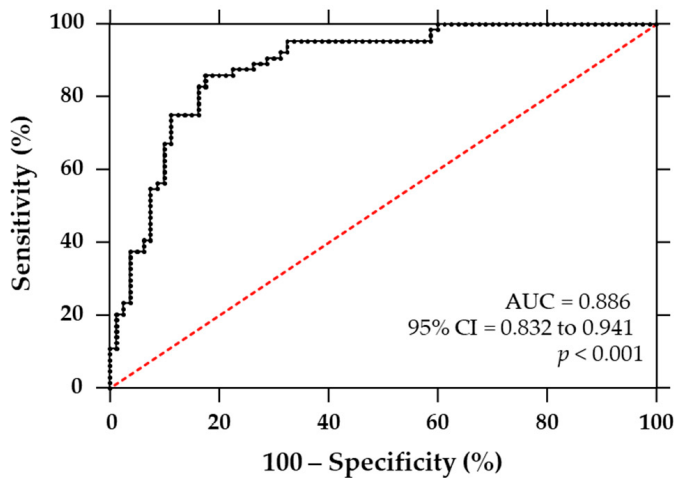


Figura 4. Análisis ROC para modelos de regresión logística binaria con el fin de diferenciar a los pacientes con EAC y DM2 comórbida de aquellos con EAC pero sin DM2. (a) Análisis ROC para el modelo de regresión logística completo, utilizando parámetros oftalmológicos significativos y concentraciones de citoquinas transformadas mediante \log_{10} ; y (b) Análisis ROC para el modelo de regresión logística reducido, utilizando \log_{10} IL-5, \log_{10} G-CSF y \log_{10} CCL11/eotaxina-1. Las probabilidades obtenidas de cada modelo de regresión logística binaria ($n = 144$, muestra total; $n = 80$, grupo sin DM2; $n = 64$, grupo con DM2) fueron utilizadas para ambos análisis ROC. Las líneas rojas discontinuas representan una clasificación completamente aleatoria.

Modelo de regresión logística reducido

Posteriormente, el modelo resultante de un método estricto de selección regresiva por pasos de Wald (es decir, probabilidad para el procedimiento por pasos: entrada = 0.05 y eliminación = 0.01) incluyó solo tres variables explicativas: concentraciones de IL-5 (OR = 1.68; IC 95% = 1.26–2.24; $p < 0.001$), G-CSF (OR = 1.06; IC 95% = 1.02–1.11; $p < 0.01$) y CCL11/eotaxina-1 (OR = 1.56; IC 95% = 1.19–2.05; $p = 0.001$)

Tabla 4. Análisis de regresión logística utilizando un método hacia atrás para diferenciar pacientes con EAC y DM2 comórbida de aquellos sin DM2.

Modelo de regresión logística completo

Variable explicativa y constante	B	Error estándar	Wald (gl)	Valor p	Exp(B) (OR)	IC 95% para OR
					Inferior	Superior
MCV ($\text{mm}^3 \times 100$)	0.340	0.139	5.986 (1)	0.014	1.405	1.070
MMT (μm)	-1.255	0.506	6.158 (1)	0.013	0.285	0.106
IL-4 (pg/mL $\times 10$)	-0.856	0.382	5.026 (1)	0.025	0.425	0.201
IL-5 (pg/mL)	0.737	0.193	14.518 (1)	<0.001	2.090	1.430

Variable explicativa y constante	B	Error estándar	Wald (gl)	Valor p	Exp(B) (OR)	IC 95% para OR
IL-6 (pg/mL)	-0.148	0.143	1.064 (1)	0.302	0.863	0.652
IL-8 (pg/mL)	0.008	0.007	1.357 (1)	0.244	1.008	0.995
IL-9 (pg/mL)	-0.304	0.200	2.312 (1)	0.128	0.738	0.499
IL-13 (pg/mL ×10)	0.386	0.151	6.536 (1)	0.011	1.471	1.094
G-CSF (pg/mL)	0.362	0.102	12.636 (1)	<0.001	1.436	1.176
GM-CSF (pg/mL)	-0.011	0.194	0.003 (1)	0.955	0.989	0.676
CCL3/MIP-1 α (pg/mL ×10)	-0.887	0.370	5.736 (1)	0.017	0.412	0.199
CCL4/MIP-1 β (pg/mL)	0.073	0.228	0.101 (1)	0.751	1.075	0.687
CCL11/eotaxina-1 (pg/mL ×10)	0.986	0.260	14.335 (1)	<0.001	2.680	1.609
Constante	0.232	6.820	0.001 (1)	0.973	1.261	—

Modelo de regresión logística reducido (Método hacia atrás: Wald)

Variable explicativa y constante	B	Error estándar	Wald (gl)	Valor p	Exp(B) (OR)	IC 95% para OR
					Inferior	Superior
IL-5 (pg/mL)	0.519	0.146	12.617 (1)	<0.001	1.680	1.262
G-CSF (pg/mL)	0.062	0.022	8.164 (1)	0.004	1.064	1.020

Variable explicativa y constante	B	Error estándar	Wald (gl)	Valor p	Exp(B) (OR)	IC 95% para OR
CCL11/eotaxina-1 (pg/mL ×10)	0.444	0.139	10.279 (1)	0.001	1.560	1.189
Constante	-4.934	0.939	27.610 (1)	<0.001	0.007	—

Abreviaciones: B = coeficiente para la constante (intersección); CI = intervalo de confianza; gl = grados de libertad para la prueba de chi-cuadrado de Wald; G-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IL = interleucina; OR = razón de momios (odds ratio); MCV = volumen del cubo macular; MIP = proteína inflamatoria de macrófagos; MMT = grosor macular medio.

Este modelo, con un buen ajuste, mantuvo un alto poder discriminatorio (AUC = 0.891; IC 95% = 0.837–0.945; $p < 0.001$). Se determinó un valor de corte óptimo para el modelo reducido de 0.378, con una sensibilidad del 85.7% y una especificidad del 80.1% (Figura 4b).

Además, los análisis individuales de regresión logística y ROC confirmaron que las concentraciones de IL-5, G-CSF y CCL11/eotaxina-1 fueron las variables más distintivas para la presencia de DM2 comórbida en pacientes con EAC (Tabla S2).

Tabla S2. Análisis de regresión logística y ROC para distinguir pacientes con EAC y DM2 comórbida de aquellos sin DM2 utilizando las concentraciones de IL-5, G-CSF o CCL11/eotaxina-1 como variables explicativas.

Análisis de regresión logística	Análisis ROC
Variable explicativa y constante	B
IL-5 (pg/mL)	0.755
Constante	-2.057
G-CSF (pg/mL)	0.086
Constante	-1.224
CCL11/eotaxina-1 (pg/mL×10)	0.654
Constante	-4.241

Abreviaturas: AUC = área bajo la curva; B = coeficiente para la constante (intercepto); IC = intervalo de confianza; gl = grados de libertad para la prueba de chi-cuadrado de Wald; G-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos; IL = interleucina; OR = razón de momios; ROC = curva de característica operativa del receptor.

Discusión

El presente trabajo integra los hallazgos de dos investigaciones independientes sobre el papel de las citoquinas en lágrimas como biomarcadores en pacientes con DM2 y su relación con la EAC. Esto es importante debido al aumento en la prevalencia de la DM2 y su asociación con complicaciones sistémicas, incluidas las manifestaciones oftalmológicas y coronarias. Por este motivo es necesario el uso biomarcadores que faciliten el seguimiento y manejo de la enfermedad. Dado el papel de la inflamación en la patogénesis de la DM2 y sus complicaciones, las citocinas han emergido como potenciales biomarcadores para una evaluación más precisa de la progresión de la enfermedad [66].

1. Perfiles Inflamatorios Distintos en Plasma y Lágrimas de Pacientes con Diabetes Tipo 2

Este estudio examinó los perfiles de citocinas en sangre y lágrimas para explorar su relación en los mismos individuos. Se observó una disminución general de las citocinas plasmáticas en pacientes con DM2 en comparación con los controles, mientras que las citocinas en lágrimas se encontraban elevadas. Es destacable que las citocinas alteradas en plasma y lágrimas no coincidieron, y no se observó correlación significativa entre los niveles de citocinas en ambos fluidos. Hasta donde se conoce, este es el primer estudio en comparar directamente los perfiles de citocinas en sangre y lágrimas en un mismo intervalo de tiempo en pacientes con DM2 controlada, lo que permitió una evaluación directa de su relación.

1.1 Perfiles de Citocinas en Plasma en la DM2

Nuestros hallazgos revelaron niveles significativamente menores de IL-2, IL-7, IL-9 y CCL4 en el plasma de pacientes con DM2 en comparación con los controles. IL-2 e IL-7 son reguladores clave del sistema inmunológico, con efectos pleiotrópicos sobre las células inmunitarias innatas y adaptativas [67]. Se ha reportado que la IL-2 permanece elevada tras la cirugía bariátrica en pacientes con DM2, pese a las mejoras en el control glucémico [68]. La IL-7, que desempeña un papel crítico en los precursores de células B, ha sido implicada en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide [69]. La CCL4 ha sido identificada como una citocina elevada en pacientes diabéticos y participa en respuestas inflamatorias asociadas con la resistencia a la insulina [70]. Sin embargo, en nuestro estudio, los niveles de CCL4 se redujeron en pacientes con DM2 bien controlada. Se ha demostrado que la inhibición de CCL4 retrasa la progresión de la hiperglucemia, reduce los niveles de TNF- α e IL-6 y mejora la resistencia a la insulina [71].

La reducción observada en estas citoquinas en pacientes con DM 2, a pesar de que la hiperglucemia está asociada con inflamación sistémica, podría atribuirse a su tratamiento farmacológico y al buen control de la enfermedad. Estudios previos sugieren que la metformina y la acarbosa disminuyen los niveles de IL-2 [72], mientras que la suplementación exógena de insulina reduce la expresión de CCL4, probablemente aliviando el estrés de las células beta [73]. Otros tratamientos antidiabéticos, como la liraglutida, se han relacionado con una reducción del estrés oxidativo y la supresión de respuestas

inflamatorias [74]. Por lo tanto, los niveles más bajos de estas citoquinas en pacientes con DM2 bien controlada podrían indicar un control de la inflamación sistémica derivado de un manejo efectivo de la enfermedad.

1.2. Perfiles de Citoquinas en Lágrimas en la Diabetes Tipo 2 sin Daño Retiniano

El análisis de la actividad inflamatoria en las lágrimas es crucial debido a las complicaciones oculares asociadas con la DM 2. Un manejo oftalmológico adecuado es esencial para prevenir complicaciones y monitorear la progresión de la enfermedad, que actualmente se realiza haciendo un screening a través de exámenes de fondo de ojo y exploraciones oftalmológicas de manera regular [75]. Dado que la inflamación precede a las principales complicaciones vasculares, se ha propuesto que las citoquinas en lágrimas podrían servir como potenciales marcadores inflamatorios. Mientras que estudios previos se han centrado, sobre todo, en las citoquinas lacrimales en la retinopatía diabética [63,64], nuestro estudio observó niveles elevados de IL-6, CXCL8, IL-15, CCL5 y VEGF en las lágrimas de pacientes con DM2 sin diagnóstico de retinopatía diabética ni otro daño retiniano. Estos hallazgos se mantuvieron significativos tras ajustar por factores de confusión como la edad, HTA y DLP.

Cabe destacar que la IL-6 se ha relacionado con la DM2 y eventos cardiovasculares, mientras que la CXCL8 se ha asociado con un perfil metabólico y lipídico desfavorable en la DM2 [76,77]. A pesar de la ausencia de una inflamación sistémica significativa, el aumento observado en las citoquinas lacrimales podría contribuir al desarrollo de complicaciones

microvasculares. La inflamación local crónica en el ojo puede promover la disfunción vascular, aumentar la permeabilidad vascular y favorecer la neovascularización retiniana, todas ellas características de la retinopatía diabética [78]. En particular, los niveles elevados de VEGF están fuertemente implicados en la angiogénesis retiniana y en la progresión de la retinopatía diabética proliferativa [63]. Además, la IL-6 y la CXCL8 se han asociado con una mayor inflamación vascular y disfunción endotelial, las cuales podrían exacerbar el daño microvascular en pacientes con diabetes, incluso cuando la inflamación sistémica está bajo control [76.77].

1.3. Comparación entre Perfiles de Citoquinas en Plasma y Lágrimas

Al comparar los perfiles de citoquinas entre el plasma y las lágrimas, no encontramos correlaciones significativas entre los niveles de citoquinas en ambos fluidos. Aunque la literatura sobre esta relación es limitada, nuestros hallazgos son consistentes con estudios previos en pacientes con uveítis, los cuales también reportaron la ausencia de correlación entre las citoquinas en lágrimas y en sangre [79]. Esto sugiere que las citoquinas en sangre y en lágrimas actúan de manera independiente, presentándose la inflamación oftalmológica como un fenómeno localizado que podría no reflejarse sistémicamente.

Una citoquina particularmente relevante en la DM2 es la IL-1 β , la cual desempeña un papel crítico en la modulación de la secreción de insulina e induce la apoptosis de las células β [80]. Se ha observado que los niveles de IL-1 β están significativamente elevados en pacientes

con retinopatía diabética, aumentando progresivamente conforme avanza la enfermedad [81]. Sin embargo, en nuestro estudio, las concentraciones de IL-1 β en plasma y lágrimas no mostraron correlación significativa, lo que refuerza la hipótesis de que la inflamación sistémica y la oftalmológica podrían seguir vías independientes.

Dado que los exámenes de fondo de ojo siguen siendo el estándar de oro para el cribado de la retinopatía diabética [82,83], las citoquinas en lágrimas podrían ofrecer una alternativa no invasiva para la detección temprana de cambios inflamatorios subclínicos que preceden a la patología microvascular manifiesta. Se requieren estudios longitudinales para determinar si los niveles elevados de citoquinas en lágrimas pueden servir como biomarcadores predictivos de la progresión de la enfermedad ocular diabética y para orientar un seguimiento oftalmológico personalizado en pacientes con DM2.

1.4. Influencia de la Edad en los Niveles de Citoquinas

El envejecimiento es un factor importante que influye en la expresión de las citoquinas. La senescencia celular y el deterioro tisular asociados con el envejecimiento afectan la composición de las lágrimas, aumentando la presencia de proteínas inflamatorias [84,85]. Nuestro estudio reveló que casi todas las citoquinas en lágrimas se vieron significativamente influenciadas por la edad, mientras que solo un subconjunto de citoquinas en plasma mostró cambios relacionados con la edad.

Este hallazgo refuerza la existencia de mecanismos regulatorios distintos para las citoquinas en sangre y en lágrimas.

1.5. Fortalezas y Limitaciones

Una de las principales fortalezas de este estudio radica en la comparación directa de los perfiles de citoquinas en sangre y lágrimas en los mismos individuos. Aunque la HbA1c sigue siendo el estándar de oro para el control glucémico y guía las decisiones terapéuticas [86], no proporciona información sobre el estado inflamatorio subyacente. Además, la población del estudio estuvo compuesta por pacientes con DM2 bien controlada y sin diagnóstico de daño vascular retiniano, lo que minimizó los efectos de confusión derivados del mal control glucémico.

Sin embargo, es necesario reconocer varias limitaciones. En primer lugar, el diseño transversal impide evaluar la causalidad o los cambios temporales en los niveles de citoquinas. Se requieren estudios longitudinales para determinar si las alteraciones en las citoquinas de las lágrimas preceden la aparición de complicaciones oculares o reflejan procesos inflamatorios en curso. En segundo lugar, aunque el tamaño muestral fue suficiente para detectar diferencias significativas entre los grupos, este se consideró adecuado para un estudio de carácter exploratorio, cuyo objetivo principal fue generar hipótesis y establecer bases metodológicas para futuras investigaciones con mayor potencia estadística. Una cohorte más amplia con distintos niveles de control glucémico y diferentes duraciones de la enfermedad permitiría mejorar la generalización de estos hallazgos.

En tercer lugar, todos los pacientes de este estudio presentaban un buen control glucémico, lo que pudo haber influido en el perfil inflamatorio sistémico observado. Estudios futuros deberían comparar las respuestas inflamatorias en pacientes con distintos grados de control glucémico para comprender mejor la progresión de la inflamación en la DM2. Asimismo, no se recogieron de forma sistemática variables potencialmente moduladoras de la inflamación, como el tratamiento farmacológico específico (por ejemplo, metformina, estatinas,

inhibidores del SGLT2 o agonistas del receptor GLP-1), así como factores relacionados con la dieta y el estilo de vida, que podrían haber influido en los niveles de citoquinas observados.

Finalmente, aunque las citoquinas en lágrimas representan una vía prometedora para la investigación de biomarcadores no invasivos, es necesaria la estandarización de los métodos de recolección y análisis, así como la evaluación de su reproducibilidad, para facilitar su aplicación clínica.

2. Evaluación de citoquinas en lágrimas en pacientes con eventos cardiovasculares previos

Como hemos visto, el monitoreo oftalmológico regular es crucial para los pacientes diabéticos con el fin de prevenir futuras complicaciones asociadas con el daño microvascular, las cuales a menudo están precedidas por un estado inflamatorio. Sin embargo, estas evaluaciones oftalmológicas también pueden resultar extremadamente útiles en el contexto de la EAC. El **segundo estudio** representa un primer intento de evaluar la utilidad de las variables oftalmológicas, derivadas principalmente de las citoquinas en lágrimas, en pacientes con trastornos cardiometabólicos.

En resumen, los principales hallazgos de este segundo estudio son los siguientes:

- Los pacientes con EAC diagnosticada y DM2 comórbida presentaron valores significativamente más bajos de MCV,MMT, RNFLT y GCLT en sus ojos en comparación con los pacientes sin DM2, tras ajustar por múltiples comparaciones.
- Los pacientes con EAC y DM2 comórbida presentaron concentraciones significativamente más altas de IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β y CCL11/eotaxina-1 en lágrimas en comparación con los pacientes sin DM2, tras ajustar por múltiples comparaciones.
- Se identificaron correlaciones inversas entre los parámetros oftalmológicos y los mediadores inflamatorios.
- Se desarrollaron modelos de regresión logística para discriminar la presencia de DM2 comórbida en pacientes con EAC, incorporando parámetros oftalmológicos seleccionados específicamente y concentraciones de citoquinas en lágrimas en función de su significación estadística, mientras se controlaba la influencia de la edad, el sexo y otros factores de riesgo cardiovascular clásicos prevalentes (como HTA, DLP, la obesidad y el hábito tabáquico). Entre las variables oftalmológicas evaluadas, las concentraciones de IL-5, G-CSF y CCL11/eotaxina-1 fueron identificadas como las variables más distintivas para discriminar entre pacientes con EAC y DM2 comórbida de aquellos sin DM2.

Por lo tanto, se pueden identificar perfiles inflamatorios distintivos en pacientes con EAC a través de las citoquinas en lágrimas utilizando una técnica rápida, segura y no invasiva. Estas

diferencias pueden indicar distintos mecanismos inflamatorios fisiopatológicos en la EAC, dependiendo de la presencia o ausencia de enfermedades metabólicas como la DM2. Dado que la identificación de estos patrones inflamatorios específicos en cada grupo de pacientes es sencilla, el monitoreo de las citoquinas en lágrimas podría ser valioso para mejorar nuestra comprensión del estado inflamatorio y el pronóstico en estos pacientes.

2.1 Parámetros oftalmológicos

Los pacientes con EAC presentaron ciertos cambios en los parámetros oftalmológicos cuando fueron evaluados en función de la presencia o ausencia de DM2 comórbida. Específicamente, se encontraron diferencias en las mediciones de MCV, MMT, RNFLT y GCLT, con valores significativamente más bajos en pacientes con DM2 comórbida. Muchas patologías oculares están asociadas con la DM2 y, aunque muchas de ellas fueron excluidas de este estudio como criterio de elegibilidad, no podemos descartar que estos hallazgos puedan estar relacionados con un estado preclínico de dichas patologías. En concordancia con esta hipótesis, varios estudios han informado una disminución en el grosor macular en pacientes con DM2 y retinopatía diabética mínima e incluso en pacientes con prediabetes en comparación con controles [87,88]. Algunos autores han vinculado esta reducción macular (por ejemplo, MCV y MMT) con una neurodegeneración en etapas tempranas, lo que podría explicar la pérdida de RNFLT y GCLT también observada en pacientes con DM2 que tienen una retinopatía diabética mínima o inexistente, en línea con nuestros hallazgos [80,90].

Además, no podemos descartar el impacto de otros factores de riesgo cardiovascular, aparte de la DM2, sobre estos parámetros oftalmológicos en pacientes con EAC. De hecho, el

análisis estadístico de nuestros datos también reveló un efecto principal significativo de la obesidad sobre MCV, MMT, RNFLT y GCLT, lo cual es consistente con numerosos estudios que han mostrado una clara asociación entre estos parámetros y la obesidad [91,92]. El impacto del índice de masa corporal sobre los parámetros oftalmológicos podría disminuir su especificidad o su capacidad para diferenciar entre pacientes con y sin DM2 en los modelos logísticos, a diferencia de las citoquinas inflamatorias en lágrimas.

2.2 Citoquinas como biomarcador

Las citoquinas desempeñan un papel crucial en la fisiopatología de diversas enfermedades cardiometabólicas y han sido evaluadas como biomarcadores inflamatorios. Por ello, la medición de citoquinas en fluidos biológicos es un enfoque fundamental para la detección temprana de la EAC y la DM2 debido a sus mecanismos inflamatorios subyacentes [93,94].

Aunque la sangre ha sido el fluido biológico preferido en la mayoría de los estudios, otros fluidos han sido utilizados en función de los órganos diana afectados por la enfermedad. Por ejemplo, el líquido cefalorraquídeo se usa para evaluar el daño cognitivo en pacientes con enfermedad de Alzheimer [95] y el líquido ascítico para evaluar la peritonitis bacteriana en pacientes con cirrosis hepática [96]. Este estudio se centra principalmente en la afectación ocular asociada con las complicaciones de la DM2 y la aterosclerosis en pacientes con EAC. Por esta razón, nos enfocamos en obtener muestras de lágrimas para la determinación de citoquinas en este fluido.

En un estudio previo se han encontrado diferencias en ciertas citoquinas dentro de muestras de lágrimas obtenidas de pacientes con sospecha de EAC, lo que sugiere un posible valor

pronóstico [61]. Sin embargo, no se observó un aumento generalizado de la inflamación asociado con el diagnóstico de EAC. Por el contrario, los hallazgos actuales proporcionan evidencia clara de que la presencia de DM2 en pacientes con EAC está vinculada a un estado inflamatorio aumentado, caracterizado por concentraciones elevadas de citoquinas inflamatorias en lágrimas.

IL-5 es producido principalmente por los linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2), aunque también puede ser secretado por mastocitos y, en menor medida, por eosinófilos. El número de estudios que han investigado los niveles de IL-5 en la sangre de pacientes con diabetes, incluyendo prediabetes y síndrome metabólico, es limitado y los resultados son contradictorios. Por lo tanto, se ha demostrado que las concentraciones de IL-5 fluctúan dependiendo del contexto clínico, con reportes de niveles tanto elevados como reducidos [97,98].

En cuanto a la EAC, un estudio basado en biobancos y bases de datos del estudio IMPROVE—una destacada cohorte prospectiva europea que incluyó individuos de alto riesgo inicialmente libres de enfermedad cardiovascular clínicamente manifiesta—concluyó que la IL-5 no es útil como biomarcador para la EAC [99]. Un estudio reciente mostró una disminución en las concentraciones séricas de citoquinas Th2, como IL-4, IL-13 e IL-5, en pacientes con EAC en comparación con controles sanos, sin diferencias significativas entre aquellos con o sin DM2 comórbida [100]. Sin embargo, nuestro estudio encontró concentraciones significativamente elevadas de todas estas citoquinas en pacientes con EAC y DM2 comórbida. Existen múltiples razones que podrían explicar esta discrepancia con el

estudio de Madhumitha et al. [100]. Por ejemplo, la influencia de otros factores de riesgo cardiovascular sobre los niveles séricos de estas citoquinas no fue controlada en sus análisis estadísticos. Además, el diagnóstico de EAC en su estudio se basó en la historia clínica de los participantes y puede no haber sido reciente. Asimismo, la edad media de los pacientes difería de la de nuestra investigación (39 años en el grupo con EAC y 61 años en el grupo con EAC y DM2 comórbida). Finalmente, la determinación de estas citoquinas se realizó en sangre en lugar de en lágrimas.

G-CSF desempeña un papel crucial en la proliferación, diferenciación y maduración de neutrófilos a partir de células progenitoras en sangre periférica, pero la DM2 afecta esta movilización. Como resultado, el G-CSF ha sido utilizado como una intervención terapéutica en el tratamiento de úlceras del pie diabético y otras complicaciones relacionadas [101,102]. Sin embargo, nuevamente, el número de estudios que exploran el G-CSF como biomarcador inflamatorio en enfermedades cardiometabólicas es limitado. Recientemente se han identificado niveles de G-CSF en lágrimas como un factor predictivo de EAC en pacientes con sospecha de esta patología [61].

En este estudio la concentración de G-CSF se encontró significativamente elevada en pacientes con lesiones coronarias y DM2 comórbida, lo que podría estar potencialmente asociado con la restauración de la movilización de células inmunes. No obstante, por otro lado, niveles elevados de G-CSF también podrían contribuir a la DM2 debido a sus propiedades de desensibilización a la insulina, como se ha demostrado previamente en células musculares humanas [103].

CCL11/eotaxina-1 es una quimiocina de la familia CC que exhibe actividad preferencial sobre los eosinófilos, aunque también es secretada por una variedad de células, como macrófagos, linfocitos, fibroblastos, células endoteliales del músculo liso, células epiteliales y condrocitos, entre otras. CCL11/eotaxina-1 se expresa en niveles elevados en sitios de patología vascular y ha sido ampliamente estudiada en relación con eventos cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis y la EAC.

Un primer estudio mostró concentraciones elevadas de CCL11/eotaxina-1 en plasma en pacientes con EAC, y esta quimiocina fue identificada como un predictor independiente de la extensión angiográfica de la enfermedad coronaria [104]. Por otro lado, la relación entre los niveles sistémicos de CCL11/eotaxina-1 y el riesgo de EAC fue examinada en el estudio PRIME—un estudio con 10 años de seguimiento de 9771 participantes masculinos—pero no fue identificada como un predictor independiente de eventos coronarios [105].

En un estudio previo sobre lágrimas, no encontramos diferencias significativas en las concentraciones de CCL11/eotaxina-1 entre pacientes con EAC y aquellos sin la enfermedad [61]. Hasta donde sabemos, no existen estudios previos que hayan cuantificado esta quimiocina en muestras de lágrimas de pacientes diabéticos. Sin embargo, una revisión sistemática y metaanálisis que comparó los niveles de CCL11/eotaxina-1 en diversos tejidos y fluidos biológicos de 621 pacientes con DM2 y 793 controles encontró que los pacientes diabéticos presentaban concentraciones significativamente más altas de esta quimiocina en comparación con los controles [70].

La mayoría de estos estudios utilizaron muestras de sangre para la determinación de CCL11/eotaxina-1, pero ninguno consideró muestras de lágrimas. Existen algunos estudios que han medido CCL11/eotaxina-1 en ojos mediante el análisis del humor vítreo, pero se han centrado en la retinopatía diabética y han reportado niveles más elevados en pacientes con DM2 y retinopatía [106].

Hasta donde sabemos, las concentraciones de IL-5, G-CSF y CCL11/eotaxina-1 emergen por primera vez como mediadores inflamatorios asociados con la coexistencia de DM2 en pacientes con EAC. Estas citoquinas discriminatorias fueron obtenidas a partir de muestras de lágrimas utilizando un procedimiento rápido, seguro y no invasivo, permitiéndonos establecer perfiles inflamatorios distintos en pacientes con lesiones coronarias.

2.3 Modelo de regresión logística

El modelo de regresión logística construido con estas citoquinas en lágrimas para distinguir entre pacientes con EAC y DM2 comórbida de aquellos sin DM2 identificó las concentraciones de IL-5, G-CSF y CCL11/eotaxina-1 como biomarcadores inflamatorios prometedores asociados con la DM2 en el fluido lagrimal de estos pacientes. De manera notable, a pesar de la ausencia de retinopatía diabética, las concentraciones de IL-5, G-CSF y CCL11/eotaxina-1 mostraron una correlación inversa significativa con MCV y MMT.

Si bien no podemos establecer una relación de causalidad entre los parámetros maculares y las concentraciones de citoquinas en lágrimas, un estudio previo sugirió que los cambios en las citoquinas inflamatorias en el humor acuoso, incluyendo niveles elevados de

CCL11/eotaxina-1, pueden contribuir a la reducción del grosor macular tras el tratamiento intravítreo para el edema macular diabético [107].

2.4 Fortalezas y Limitaciones

Reconocemos varias limitaciones en nuestro estudio, principalmente relacionadas con su diseño unicéntrico y el tamaño de la muestra. Se requiere más investigación para validar nuestros hallazgos en poblaciones más amplias de pacientes con EAC, incluyendo muestras de mayor tamaño. Esto permitiría diferenciar los subtipos de EAC (es decir, angina estable, SCACEST y SCASEST) y realizar una evaluación más completa de la edad, el sexo y todos los factores de riesgo cardiovascular clásicos, además de la DM2, sin restricciones estadísticas. Aunque la EPOC y la enfermedad renal crónica no fueron incluidas en el análisis multivariable debido a su baja prevalencia en nuestra muestra, no se puede descartar su posible impacto en los parámetros oftalmológicos y/o en los mediadores inflamatorios en lágrimas. Además, se requieren estudios longitudinales futuros para monitorear los cambios en los niveles de citoquinas en lágrimas a lo largo del tiempo y examinar su correlación con las características clínicas durante la progresión de la enfermedad. Los resultados de estos estudios serán fundamentales para establecer el papel de estas variables oftalmológicas en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con EAC, particularmente en aquellos con DM2, incluso en etapas tempranas sin síntomas de complicaciones oculares.

Por otro lado, en nuestro estudio no se pudieron cuantificar todos los analitos inflamatorios evaluados (es decir, IL-2, IL-10, IL-12p70, IL-15 y VEGF), lo que puede deberse a limitaciones técnicas o a su ausencia en este fluido. Además, es importante señalar que las

concentraciones de citoquinas proinflamatorias prototípicas, como IL-1 β y TNF- α , no parecieron estar significativamente afectadas por la presencia de DM2, en contraste con los hallazgos observados en otros estudios [81,108]. Sin embargo, debemos considerar que casi todos esos estudios se realizaron en muestras de sangre (es decir, suero y plasma) y en pacientes que podrían no haber presentado complicaciones cardiovasculares, como ocurre en nuestro estudio. Por lo tanto, será necesario comparar las alteraciones inflamatorias tanto en sangre como en lágrimas en los mismos pacientes para determinar posibles interacciones entre estos dos compartimentos biológicos, uno de carácter sistémico y el otro más localizado.

Por último, los análisis realizados en muestras de lágrimas en este estudio no tienen como objetivo principal identificar biomarcadores específicos de DM2 en el contexto de la EAC, más allá de una mera sugerencia debido a las limitaciones descritas. En cambio, ponen de manifiesto la presencia de distintos perfiles inflamatorios en pacientes con EAC mediante un procedimiento no invasivo que incorpora variables oftalmológicas. Si bien los mecanismos moleculares y fisiológicos subyacentes a estas alteraciones oftalmológicas requieren una mayor clarificación en estudios futuros, estos hallazgos son lo suficientemente relevantes como para ser discutidos en el contexto de los trastornos cardiometabólicos.

Conclusiones

Este trabajo ha permitido identificar un perfil inflamatorio diferencial en las lágrimas de pacientes con DM2 y su relación con la EAC, resaltando el papel potencial de las citoquinas lagrimales como biomarcadores no invasivos en la evaluación de la inflamación ocular y sistémica en estos pacientes.

Los hallazgos del primer estudio demuestran que los pacientes con DM2 presentan un perfil inflamatorio en lágrimas caracterizado por un aumento significativo de IL-6, CXCL8, IL-15, CCL5 y VEGF, mientras que los marcadores inflamatorios sistémicos en sangre muestran una reducción relativa. La ausencia de correlación entre los niveles de citoquinas en plasma y lágrimas sugiere que la inflamación oftalmológica ocurre de manera independiente a la inflamación sistémica. Estos resultados refuerzan la utilidad de las citoquinas lagrimales como herramientas potenciales para detectar cambios inflamatorios tempranos en la DM2, lo que podría ayudar a prevenir complicaciones oftalmológicas y mejorar el seguimiento de la progresión de la enfermedad.

El segundo estudio amplía este conocimiento al evaluar la utilidad de las citoquinas en lágrimas en pacientes con EAC y DM2 comórbida. Se observó que estos pacientes presentaban disminuciones significativas en parámetros oftalmológicos clave (MCV, MMT, RNFLT y GCLT), junto con un incremento en la concentración de múltiples citoquinas inflamatorias en lágrimas, incluyendo IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β y CCL11/eotaxina-1. Además, se identificó

una correlación inversa entre los parámetros oftalmológicos y los niveles de citoquinas en lágrimas, sugiriendo un papel potencial de la inflamación ocular en la progresión de la enfermedad cardiovascular en pacientes diabéticos.

De manera destacada, las concentraciones de IL-5, G-CSF y CCL11/eotaxina-1 fueron identificadas como mediadores inflamatorios predictivos de la coexistencia de DM2 en pacientes con EAC, incluso tras ajustar por otros factores de riesgo cardiovascular clásicos como HTA, DLP, obesidad, tabaquismo, sexo y edad. Estos hallazgos sugieren que las citoquinas en lágrimas podrían ser una herramienta complementaria en la estratificación del riesgo, el diagnóstico y el pronóstico de pacientes con enfermedades cardiometabólicas.

A pesar de las limitaciones inherentes a estos estudios, como el tamaño muestral y el diseño unicéntrico, los resultados obtenidos respaldan la viabilidad del uso de biomarcadores en lágrimas como una estrategia innovadora y no invasiva para evaluar la inflamación en la DM2 y la EAC. Futuros estudios deberán validar estos hallazgos en poblaciones más amplias y explorar su aplicabilidad clínica en la predicción y el seguimiento de complicaciones tanto oftalmológicas como cardiovasculares en pacientes con DM2.

Bibliografía

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Global trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-based studies with 141 million participants. *Lancet*. 2024.
2. Green A, Hede SM, Patterson CC, et al. Diabetes tipo 1 en 2017: estimaciones globales de incidentes y casos prevalentes en niños y adultos. *Diabetologia*. 2021;64:2741.
3. Guadarrama-López AL, Valdés-Ramos R, Martínez-Carrillo BE. Type 2 diabetes, PUFAs, and vitamin D: their relation to inflammation. *J Immunol Res*. 2014;2014:860703.
4. Magliano, D. J., & Boyko, E. J. (Eds.). (2021). *IDF Diabetes Atlas (10ª ed.)*. Federación Internacional de Diabetes.
5. Standards of Medical Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*, 46(Suppl 1), S1–S304.
6. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27 Suppl 3:S53-S55.
7. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1793-801.
8. Zhang, K., Kan, C., Han, F., et al. (2023). Global, Regional, and National Epidemiology of Diabetes in Children From 1990 to 2019. *JAMA Pediatrics*, 177(8), 837–846.
9. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2008 Jun 28;371(9631):2153-6.

10. Beck-Nielsen H, Groop LC. Caracterización metabólica y genética de los estados prediabéticos. Secuencia de eventos que conducen a diabetes mellitus no dependiente de la insulina. *J Clin Invest*. 1994;94:1714.
11. Birules Pons, M., & Fernández Fernández, I. (2003). Criterios de cribado y diagnóstico de diabetes mellitus. *Atención Primaria*, 31(5), 334–336.
12. American Diabetes Association. (2023). Standards of Medical Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*, 46(Suppl 1), S1–S304. (es igual que el 5, pero capítulo 2) ok
13. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): results of feasibility study. The DCCT Research Group. *Diabetes Care*. 1987 Jan-Feb;10(1):1-19.
14. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 7. Diabetes Technology: Standards of Care in Diabetes—2025. *Diabetes Care*. 2025;48(Supplement_1):S146-S166. doi:10.2337/dc25-S007.
15. Mulvihill, C., Brooks, A., Basudev, N., & Lincoln, P. (2022). Continuous glucose monitoring for adults and children with diabetes: summary of updated NICE guidance. *BMJ*, 379, o2418.
16. Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813–820.
17. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):168-175.
18. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129-2138.
19. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27 Suppl 3:S53-S55.

20. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):98-107.
21. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204-212.
22. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;93(1):137-88.
23. Carr ME Jr. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications.* 2001;15(1):44-54.
24. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404(6779):787-790.
25. Yu S, Meng S, Xiang M, Ma H. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cell metabolism: Roles and mechanisms beyond gluconeogenesis. *Mol Metab.* 2021 Nov;53:101257.
26. Navarro JF, Mora C. Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(12):2601-2604.
27. Kanwar YS, Sun L, Xie P, et al. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:395-423.
28. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem.* 2007;102(6):1358-1367.
29. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(2):143-159.
30. 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, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract. 2019;157:107843.
31. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. N Engl J Med. 2002;346(6):393-403.
 32. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin Sci (Lond). 2012;122(6):253-270.
 33. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. N Engl J Med. 2017;377(7):644-657.
 34. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. N Engl J Med. 2016;375(4):311-322.
 35. Monami M, Genovese S, Mannucci E. Cardiovascular safety of sulfonylureas: a meta-analysis of randomized clinical trials. Diabetes Obes Metab. 2013;15(10):938-953.
 36. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, et al. Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. N Engl J Med. 2013;369(14):1317-1326.
 37. Consoli A, Devangelio E. Thiazolidinediones and inflammation. Lupus. 2005;14(9):794-7.
 38. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. Lancet. 2005;366(9493):1279-1289.
 39. Dinarello CA. Percepciones históricas sobre las citocinas. Eur J Immunol. 2007;37(Suplente 1):S34-S45.

40. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-867.
41. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(4):311-322. (=33)
42. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier. 2021.
43. Ridker PM, MacFadyen JG, Glynn RJ, Bradwin G, Hasan AA, Rifai N. Comparison of interleukin-6, C-reactive protein, and low-density lipoprotein cholesterol as biomarkers of residual risk in contemporary practice: secondary analyses from the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial. *Eur Heart J*. 2020 Aug 14;41(31):2952-2961.
44. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin resistance. *Nature*. 2021;444(7121):860-867.
45. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Immunological biomarkers for cancer prognosis and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(8):487-503.
46. Wagner , Mandal M, Yan M, et al. Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2020;217(1):e20190460.
47. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Arthritis reumatoide. *Lancet*. 2016;388(10055):2023-38.
48. Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol*. 2021;22(5):1-8.
49. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41-101.

50. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-3732.
51. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020;26(10):1636-1643.
52. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1 receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2007;356(15):1517-1526.
53. Zhang H, Dhalla NS. The Role of Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2024;25(3):1082-1094.
54. Williams JW, Huang LH, Randolph GJ. Cytokine circuits in cardiovascular disease. *Immunity*. 2019;50(4):941-954.
55. Navarro JF, Mora C. Diabetes, inflammation, proinflammatory cytokines, and diabetic nephropathy. *Sci World J*. 2006;6:908-917.
56. Vujosevic S, Simó R. Local and Systemic Inflammatory Biomarkers of Diabetic Retinopathy: An Integrative Approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 May 1;58(6):BIO68-BIO75.
57. Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Pareja-Rios A. Diabetic macular edema pathophysiology: Vasogenic versus inflammatory. *J Diabetes Res*. 2016;2016:2156273.
58. Amorim M, Martins C, Caramelo F, Gonçalves I, Trindade D, Simão S, Barreto MP, Marques T, Leal EC, Carvalho RA, Reis F, Ribeiro-Rodrigues TM, Girão H, Rodrigues-Santos P, Farinha C, Ambrósio AF, Silva AP, Fernandes R. Putative biomarkers in tears for diabetic retinopathy diagnosis. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:873483.

59. Roda M, Corazza I, Bacchi Reggiani ML, Pellegrini M, Taroni L, Giannaccare G, et al. Dry eye disease and tear cytokine levels—a meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2020;21:3111.
60. Zhang H, Cao X, Liu Y, Wang P, Li X. Tear levels of inflammatory cytokines in keratoconus: a meta-analysis of case-control and cross-sectional studies. *Biomed Res Int.* 2021;2021:1–17.
61. Romero-Trejejo JL, Fernández-Romero L, Delgado J, Muñoz-García E, Sánchez-Pérez A, Murri M, et al. Choroidal thickness and granulocyte colony-stimulating factor in tears improve the prediction model for coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2022;21:103.
62. Rosenberg JB, Tsui I. Screening for diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2017;376:1587–8.
63. Liu J, Shi B, He S, Yao X, Willcox MDP, Zhao Z. Changes to tear cytokines of type 2 diabetic patients with or without retinopathy. *Mol Vis.* 2010;16:2931–8.
64. Sorkhabi R, Ahoor MH, Ghorbani Haghjo A, Tabei E, Taheri N. Assessment of tear inflammatory cytokines concentration in patients with diabetes with varying severity of involvement. *Exp Eye Res.* 2022;224:109233.
65. Murthy KR, Grover S, Begum R, et al. Proteomic analysis of human vitreous humor. *Clin Proteomics.* 2013;10(1):14.

66. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Sep;94(9):3171-82.
67. Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The γ c family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. *Immunity.* 2019;50(4):832–50.
68. Katsogiannos P, Kamble PG, Pereira MJ, Sundbom M, Carlsson PO, Eriksson JW, et al. Changes in circulating cytokines and adipokines after RYGB in patients with and without type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring).* 2021;29(3):535–42.
69. Meyer A, Parmar PJ, Shahrara S. Significance of IL-7 and IL-7R in RA and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2022;21(7):103120.
70. Pan X, Kaminga AC, Wen SW, Liu A. Chemokines in prediabetes and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Front Immunol.* 2021;12:622438.
71. Chang TT, Lin LY, Chen JW. A Novel Resolution of Diabetes: C-C Chemokine Motif Ligand 4 Is a Common Target in Different Types of Diabetes by Protecting Pancreatic Islet Cell and Modulating Inflammation. *Front Immunol.* 2021;12:650626.
72. Mo D, Liu S, Ma H, Tian H, Yu H, Zhang X, et al. Effects of acarbose and metformin on the inflammatory state in newly diagnosed type 2 diabetes patients: a one-year randomized clinical study. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:2769–76.
73. Pflieger C, Kaas A, Hansen L, Alizadeh B, Hougaard P, Holl R, et al. Relation of circulating concentrations of chemokine receptor CCR5 ligands to C-peptide, proinsulin and HbA1c and disease progression in type 1 diabetes. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2008 Jul;128(1):57–65.

74. Liu X, Huang J, Li J, Mao Q, He J. Effects of Liraglutide Combined with Insulin on Oxidative Stress and Serum MCP-1 and NF- κ B Levels in Type 2 Diabetes. *J Coll Physicians Surg--Pak JCPSP*. 2019 Mar;29(3):218–21.
75. Sender Palacios MJ, Vernet Vernet M, Maseras Bové M, Salvador Playà A, Pascual Batlle L, Ondategui Parra JC, et al. Oftalmopatía en la diabetes mellitus: detección desde la Atención Primaria de salud. *Aten Primaria*. 2011;43(1):41-8.
76. Siewko K, Maciulewski R, Zielinska-Maciulewska A, Poplawska-Kita A, Szumowski P, Wawrusiewicz-Kurylonek N, et al. Interleukin-6 and Interleukin-15 as Possible Biomarkers of the Risk of Autoimmune Diabetes Development. *BioMed Res Int*. 2019;2019:4734063.
77. Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2017;27(3):229–36.
78. Kaštelan S, Orešković I, Bišćan F, Kaštelan H, Gverović Antunica A. Inflammatory and angiogenic biomarkers in diabetic retinopathy. *Biochem Medica*. 2020 Oct 15;30(3):030502.
79. García-Onrubia L, Mateos Olivares M, García-Vázquez C, Enríquez-de-Salamanca A, Cocho L, Herreras Cantalapiedra JM. Tear and Plasma Levels of Cytokines in Patients with Uveitis: Search for Active Disease Biomarkers. *J Clin Med*. 2022 Nov 28;11(23):7034.
80. Alfadul H, Sabico S, Al-Daghri NM. The role of interleukin-1 β in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol*. 2022;13:901616.
81. Qian J, Huang Y. Expression of TNF- α and IL-1 β in Peripheral Blood of Patients with T2DM Retinopathy. *Comput Math Methods Med*. 2022;2022:9073372.

82. Medina M, Mora N, Coma E, Mas A. Evolución de los indicadores de cribado y control de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 a lo largo de 16 años (2007-2022) [Evolution of the screening and control quality indicators of patients with type 2 diabetes mellitus over 16 years (2007-2022)]. *Aten Primaria*. 2023 Apr;55(4):102588.
83. Romero-Aroca P, López-Galvez M, Martínez-Brocca MA, Pareja-Ríos A, Artola S, Franch-Nadal J et al. Changes in the Epidemiology of Diabetic Retinopathy in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Healthcare*. 2022 Jul 16;10(7):1318.
84. Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med* Maywood NJ. 2013 May;238(5):450–60.
85. Micera A, Di Zazzo A, Esposito G, Longo R, Foulsham W, Sacco R, et al. Age-Related Changes to Human Tear Composition. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018 Apr 1;59(5):2024–31.
86. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*. 2023 Jan 1;46(Suppl 1):S140–57.
87. Biallostowski, C.; van Velthoven, M.E.; Michels, R.P.; Schlingemann, R.O.; DeVries, J.H.; Verbraak, F.D. Decreased optical coherence tomography-measured pericentral retinal thickness in patients with diabetes mellitus type 1 with minimal diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol*. 2007, 91, 1135–1138.
88. De Clerck, E.E.B.; Schouten, J.S.A.G.; Berendschot, T.T.J.M.; Goezinne, F.; Dagnelie, P.C.; Schaper, N.C.; Schram, M.T.; Stehouwer, C.D.A.; Webers, C.A.B. Macular thinning in prediabetes or type 2 diabetes without diabetic retinopathy: The Maastricht Study. *Acta Ophthalmol*. 2018, 96, 174–182.

89. Lonneville, Y.H.; Ozdek, S.C.; Onol, M.; Yetkin, I.; Gürelik, G.; Hasanreisoglu, B. The effect of blood glucose regulation on retinal nerve fiber layer thickness in diabetic patients. *Ophthalmologica* 2003, 217, 347–350.
90. Lopes de Faria, J.M.; Russ, H.; Costa, V.P. Retinal nerve fibre layer loss in patients with type 1 diabetes mellitus without retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 2002, 86, 725–728.
91. von Hanno, T.; Hareide, L.L.; Sm.brekke, L.; Morseth, B.; Sneve, M.; Erke, M.G.; Mathiesen, E.B.; Bertelsen, G. Macular Layer Thickness and Effect of BMI, Body Fat, and Traditional Cardiovascular Risk Factors: The Troms. Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2022, 63, 16.
92. Dogan, B.; Kazim Erol, M.; Dogan, U.; Habibi, M.; Bulbulla, N.; Turgut Coban, D.; Bulut, M. The retinal nerve fiber layer, choroidal thickness, and central macular thickness in morbid obesity: An evaluation using spectral-domain optical coherence tomography. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016, 20, 886–891.
93. Hameed, I.; Masoodi, S.R.; Mir, S.A.; Nabi, M.; Ghazanfar, K.; Ganai, B.A. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J. Diabetes* 2015, 6, 598–612.
94. Li, H.; Sun, K.; Zhao, R.; Hu, J.; Hao, Z.; Wang, F.; Lu, Y.; Liu, F.; Zhang, Y. Inflammatory biomarkers of coronary heart disease. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2017, 22, 504–515.
95. Altuna-Azkargorta, M.; Mendioroz-Iriarte, M. Blood biomarkers in Alzheimer's disease. Biomarcadores sanguíneos en la enfermedad de Alzheimer. *Neurol. (Engl. Ed.)* 2018, S0213–S4853, 30091–30094.

96. Bracho-Riquelme, R.L.; Reyes-Romero, M.A.; Torres-Valenzuela, A.; Flores-García, A.I. The grade-response relation between severity of peritonitis and serum cytokine concentrations explains Mannheim Peritonitis Index threshold. *Surg. Infect. (Larchmt)* 2010, 11, 379–386.
97. Surendar, J.; Mohan, V.; Rao, M.M.; Babu, S.; Aravindhan, V. Increased levels of both Th1 and Th2 cytokines in subjects with metabolic syndrome (CURES-103). *Diabetes Technol. Ther.* 2011, 13, 477–482.
98. Ahmad, R.; Al-Roub, A.; Koshy, M.; Sindhu, S.; Behbehani, K. Relationship of IL-5 with Th1 and Th2 cytokines in individuals with or without type-2 diabetes. *J. Glycom. Lipidom.* 2015, 5, 134.
99. Silveira, A.; McLeod, O.; Strawbridge, R.J.; Gertow, K.; Sennblad, B.; Baldassarre, D.; Veglia, F.; Deleskog, A.; Persson, J.; Leander, K.; et al. Plasma IL-5 concentration and subclinical carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2015, 239, 125–130.
100. Madhumitha, H.; Mohan, V.; Deepa, M.; Babu, S.; Aravindhan, V. Aravindhan Increased Th1 and suppressed Th2 serum cytokine levels in subjects with diabetic coronary artery disease. *Cardiovasc. Diabetol.* 2014, 13, 1.
101. Fadini, G.P.; DiPersio, J.F. Diabetes mellitus as a poor mobilizer condition. *Blood Rev.* 2018, 32, 184–191.
102. Mahdipour, E.; Sahebkar, A. The Role of Recombinant Proteins and Growth Factors in the Management of Diabetic Foot Ulcers: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J. Diabetes Res.* 2020, 2020, 6320514.
103. Ordelheide, A.M.; Gommer, N.; B.hm, A.; Hermann, C.; Thielker, I.; Machicao, F.; Fritsche, A.; Stefan, N.; H.ring, H.U.; Staiger, H. Granulocyte colony-stimulating

- factor (G-CSF): A saturated fatty acid-induced myokine with insulin-desensitizing properties in humans. *Mol. Metab.* 2016, 5, 305–316.
104. Emanuele, E.; Falcone, C.; D'Angelo, A.; Minoretti, P.; Buzzi, M.P.; Bertona, M.; Geroldi, D. Association of plasma eotaxin levels with the presence and extent of angiographic coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2006, 186, 140–145.
105. Canou-Poitrine, F.; Luc, G.; Mallat, Z.; Machez, E.; Bingham, A.; Ferrieres, J.; Ruidavets, J.B.; Montaye, M.; Yarnell, J.; Haas, B.; et al. Systemic chemokine levels, coronary heart disease, and ischemic stroke events: The PRIME study. *Neurology* 2011, 77, 1165–1173.
106. Zeng, Y.; Cao, D.; Yu, H.; Hu, Y.; He, M.; Yang, D.; Zhuang, X.; Zhang, L. Comprehensive analysis of vitreous humor chemokines in type 2 diabetic patients with and without diabetic retinopathy. *Acta Diabetol.* 2019, 56, 797–805.
107. Shiraya, T.; Kato, S.; Araki, F.; Ueta, T.; Miyaji, T.; Yamaguchi, T. Aqueous cytokine levels are associated with reduced macular thickness after intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema. *PLoS ONE* 2017, 12, e0174340.
108. Liu, C.; Feng, X.; Li, Q.; Wang, Y.; Li, Q.; Hua, M. Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* 2016, 86, 100–109.

ANEXOS

AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Comité de Ética de la Investigación Provincial de Málaga

Dra. Dña. Gloria Luque Fernández, Secretaria del CEI Provincial de Málaga

CERTIFICA:

Que en la sesión de CEI de fecha: 24/05/2018 ha evaluado la propuesta de D/Dña.: Manuel Jiménez Navarro, referido a l Proyecto de Investigación: "Determinación de la utilidad predictiva de los hallazgos oftalmológicos observados en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad coronaria".

Este Comité lo considera ética y metodológicamente correcto.

La composición del CEI en esta sesión es la siguiente:

- | | |
|--|---|
| Dra. Ana Alonso Torres (UGC Neurociencias) | D. Ramón Porras Sánchez (RRHH-Abogado) |
| Dra. Encarnación Blanco Reina (Farmacología Clínica) | Dra. M ^o Angeles Rosado Souvirón (UGC Farmacia) |
| Dra. Marta Camacho Caro (UGC Ginecología) | Dra. Leonor Ruiz Sicilia (UGC Salud Mental) |
| Dr. José C. Fernández García (UGC Endocrinología y Nutrición) | Dra. M ^o Victoria de la Torre Prados (UGC UMI) |
| Dra. M ^o Angeles Gertrudis Díez (Médico Familia) | Dr. José M. Trigo Pérez (UGC Oncología) |
| Dr. Ricardo Guijarro Merino (UGC M. Interna) | Dra. M ^o Carmen Vela Márquez (Farmacéutica Distrito) |
| Dr. José L. Guerrero Orriach (UGC Anestesia y Reanimación) | |
| Dr. Antonio E. Guzmán Guzmán (UGC Farmacia Hospitalaria) | |
| Dr. Manuel Herrera Gutiérrez (UGC UCI) | |
| Dr. José Leiva Fernández (Médico Familia) | |
| Dña. Carmen López Gálvez del Postigo (Miembro Lego) | |
| Dr. Antonio López Téllez (Médico de Familia) | |
| Dra. Gloria Luque Fernández (Investigación) | |
| Dra. M ^o Mercedes Márquez Castilla (Médico Familia) | |
| Dr. Fermín Mayoral Cleries (UGC Salud Mental) | |
| Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga (Laboratorio) | |
| Dra. Eva Mingot Castellanos (UGC Hematología) | |
| Dr. Victor Navas López (UGC Pediatría) | |

Se emite nuevo dictamen con cambio del título del proyecto

Lo que firmo en Málaga, a 25 de Mayo de 2018

Fdo.: Dra. Gloria Luque Fernández
Secretaria del CEI

Dra. Dña. Gloria Luque Fernández, Secretaria del CEI Provincial de Málaga

CERTIFICA:

Que en la sesión de CEI de fecha: 25/05/2023 ha evaluado la propuesta de D/Dña.: Rafael José Jiménez López referido a al proyecto de investigación: "Determinación de la utilidad predictiva de citoquinas halladas en sangre y lágrimas en pacientes con DM-2, así como su concordancia entre ambos líquidos biológicos".
Este Comité lo considera ética y metodológicamente correcto.

La composición del CEI en esta sesión es la siguiente:

- Dra. M^a Victoria de la Torre Prados (UMA)
- Dr. José Leiva Fernández (Médico Familia)
- Dra. Ana Alonso Torres (UGC Neurociencias)
- Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga (Laboratorio)
- Dra. Gloria Luque Fernández (Investigación)
- Dra. Nieves Bel Peña (Enfermería)
- Dr. Juan Carlos Navarro Barrios (Psiquiatría, Centro de Salud El
- Dña. Carmen López Gálvez del Postigo (Miembro Lego)
- Dra. M^a Dolores López Carmona (Medicina Interna)
- Dr. Jesús López del Peral (Esp.Protec.Datos)
- Dr. Manuel Herrera Gutiérrez (UGC UCI)


Málaga, a 6 de junio de 2023

Fdo.: Dra. Gloria Luque Fernández
Secretaria del CEI

Compromiso del investigador

COMPROMISO DEL INVESTIGADOR

Don Rafael José Jiménez López,

Hace constar:




1. Que conoce y acepta participar como investigador principal en el “ Determinación de la utilidad predictiva de citoquinas halladas en sangre y lágrimas en pacientes con DM-2, así como su concordancia entre ambos líquidos biológicos”, realizado en el Centro de Salud de Alhaurín el Grande (Málaga).
2. Que cuenta con los recursos materiales y humanos necesarios para llevar a cabo el ensayo clínico, sin que ello interfiera en la realización de otro tipo de estudios ni en otras tareas que tiene habitualmente encomendadas.
3. Que se compromete a que cada sujeto sea tratado y controlado siguiendo lo establecido en el protocolo con dictamen favorable por el Comité Ético de la Investigación.
4. Que respetará las normas éticas y legales aplicables a este tipo de estudios y seguirá las normas de buena práctica clínica en su realización.
5. Que dicho estudio se llevará a cabo contando con la colaboración, como investigadores colaboradores, de:
 - a. Ada del Mar Carmona Segovia
 - b. Ángel Manuel Gutiérrez García
 - c. Manuel Jiménez Navarro
 - d. Francisco Javier Pavón Morón

En Málaga, a 2 de mayo de 2023

Firmado:
El investigador principal


Rafael Jiménez

Firmado:
Investigadores Colaboradores

Hoja de información del paciente

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Determinación de la utilidad predictiva de citoquinas halladas en sangre y lágrimas en pacientes con DM-2, así como su concordancia entre ambos líquidos biológicos

CENTRO DEL ESTUDIO: Centro de Salud Alhaurín el Grande, Málaga.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Rafael José Jiménez López

1.Objetivo

El objetivo principal del proyecto es el de determinar la utilidad predictiva de citoquinas obtenidas tanto en lágrima como en sangre en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 .

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

- Valorar si existe un aumento de citoquinas proinflamatorias en pacientes con Diabetes Mellitus en comparación con no diabéticos.
- Comparar las citoquinas en lágrimas con respecto a las citoquinas en sangre, para ver si son las mismas citoquinas las que aumentan en ambos líquidos biológicos.

2. Metodología empleada

Los pacientes participantes, obtenidos desde una consulta de atención primaria, tras verificar el cumplimiento de los criterios de inclusión, se distribuirán, de acuerdo con sus características, en uno de los siguientes grupos:

- Grupo 1: Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2
- Grupo 2: Pacientes sin Diabetes Mellitus Tipo 2

3. Tratamiento o intervención que puede serle administrado

En cada uno de los pacientes se llevarán a cabo las siguientes mediciones o intervenciones:

- Toma de muestra sanguínea.
- Toma de muestra de la lágrima.

En caso de dudas sobre las técnicas a emplear, el participante podrá ser informado más detenidamente al respecto antes de su realización.

4. Beneficios esperados para él o la sociedad

En caso de confirmar la hipótesis de trabajo, los resultados obtenidos permitirían instaurar un seguimiento y un manejo terapéutico más individualizado de la enfermedad diabética, con el objetivo de prevenir la aparición de efectos adversos causado por la inflamación de la enfermedad.

Esta prevención permitiría un ahorro de recursos importante en el sistema sanitario público, teniendo en cuenta la alta prevalencia de la diabetes entre la población de nuestro medio.

5. Incomodidades y riesgos derivados del estudio (número de visitas, pruebas complementarias a que se someterá...)

Las incomodidades y riesgos derivados del estudio se prevén mínimas, debido a que las extracciones tanto de sangre como la obtención de lágrimas son procesos poco invasivos y muy pocos efectos adversos, de baja gravedad y frecuencia.

6. Posibles acontecimientos adversos

En el desarrollo de este proyecto de investigación no se espera la aparición de acontecimientos adversos como consecuencia de sus actuaciones.

7. Tratamientos alternativos disponibles

Al no tratarse de un estudio de intervención, no procede la aplicación de ningún tratamiento sobre los pacientes.

8. Carácter voluntario de la participación y posibilidad de abandono

El paciente colaborará de forma voluntaria en el desarrollo de este estudio, pudiendo retirarse del mismo en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin que por ello se altere

su relación con el médico ni se produzca perjuicio en su tratamiento o en la atención que pueda necesitar. También debe saber que puede ser excluido del estudio si los investigadores del mismo lo consideran oportuno.

Por otro lado, ni el paciente ni los investigadores recibirán remuneración ni beneficio económico por participar en el estudio, no suponiendo dicha participación ningún gasto para los participantes.

9. Protección de datos

Las únicas personas que tendrán acceso a los datos de los pacientes serán los investigadores responsables del desarrollo del estudio, manteniéndose la confidencialidad de los mismos y cumpliendo con la normativa en vigor al respecto (LOPD 15/1999 de 13 de diciembre).

10. Investigador responsable

El paciente conoce al investigador responsable del estudio y de informar al sujeto y contestar a sus dudas y preguntas (Dr. Rafael José Jiménez López), así como el modo de contactar con él en caso de urgencia (Unidad de Investigación. Hospital Virgen de la Victoria, Málaga).

Se hace entrega al paciente de una copia.

Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio:

Determinación de la utilidad predictiva de citoquinas halladas en sangre y lágrimas en pacientes con DM-2, así como su concordancia entre ambos líquidos biológicos

Yo,

He leído la hoja de información que se me ha entregado,
he podido hacer preguntas sobre el estudio,
he recibido suficiente información sobre el estudio,
he hablado con(nombre del investigador),
comprendo que mi participación es voluntaria,
comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados o atención sanitaria.

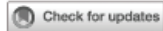
Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

En Málaga, a de de 20.....

Fdo.:
Participante

Fdo.:
Investigador responsable

Artículo 1: Perfiles Inflamatorios Distintos en Plasma y Lágrimas resaltan un perfil inflamatorio en lágrimas en pacientes con diabetes Mellitus tipo 2 sin retinopatía asociada.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Beatrice Dufrusine,
University of Teramo, ItalyREVIEWED BY
Mugdha V. Joglekar,
Western Sydney University, Australia
Vincenzo Barone,
Campus Bio-Medico University, Italy*CORRESPONDENCE
Manuel Jiménez-Navarro
✉ mjimeneznavarro@uma.es
Francisco Javier Pavón-Morón
✉ Javier.pavon@ibima.eu†These authors have contributed equally to
this work and share first authorshipRECEIVED 05 June 2025
ACCEPTED 29 August 2025
PUBLISHED 15 September 2025CITATION
Jiménez-López R, Martín-Chaves L,
Gutiérrez-García AM,
Carmona-Segovia ADM, Mora-Ordoñez B,
Sánchez-García AM, Fernández-Romero L,
Murri M, Sánchez-Quintero MJ,
Berteli-García G, Sánchez-Chaparro MA,
Bodi V, Rodríguez-Capitán J,
Jiménez-Navarro M, Pavón-Morón FJ and
Romero-Trejejo JL (2025) Distinct cytokine
profiles in plasma and tears highlight
ophthalmologic inflammation in type 2
diabetes without retinopathy.
Front. Med. 12:1631334.
doi: 10.3389/fmed.2025.1631334COPYRIGHT
© 2025 Jiménez-López, Martín-Chaves,
Gutiérrez-García, Carmona-Segovia,
Mora-Ordoñez, Sánchez-García,
Fernández-Romero, Murri,
Sánchez-Quintero, Berteli-García,
Sánchez-Chaparro, Bodi, Rodríguez-Capitán,
Jiménez-Navarro, Pavón-Morón and
Romero-Trejejo. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Distinct cytokine profiles in plasma and tears highlight ophthalmologic inflammation in type 2 diabetes without retinopathy

Rafael Jiménez-López^{1,2,3†}, Laura Martín-Chaves^{1,3,4,5†},
Ángel Manuel Gutiérrez-García⁶,
Ada del Mar Carmona-Segovia^{1,3,4,5}, Begoña Mora-Ordoñez^{1,2},
Ana María Sánchez-García^{1,7}, Lourdes Fernández-Romero¹,
Mora Murri^{1,4,8}, María José Sánchez-Quintero^{1,4,5},
Germán Berteli-García^{1,4}, Miguel Ángel Sánchez-Chaparro^{1,9},
Vicente Bodi^{5,10}, Jorge Rodríguez-Capitán^{1,4,5},
Manuel Jiménez-Navarro^{1,3,4,5*},
Francisco Javier Pavón-Morón^{1,4,5*} and
José Lorenzo Romero-Trejejo^{1,3,11}¹Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (IBIMA Plataforma BIONAND), Málaga, Spain, ²Servicio de Urgencias, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain, ³Departamento de Medicina y Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, ⁴Servicio de Cardiología y Cirugía Cardiovascular-Área del Corazón, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain, ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ⁶Centro de Salud Rincón de la Victoria, Rincón de la Victoria, Spain, ⁷Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain, ⁸Centro de Investigación Biomédica en Red en Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ⁹Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain, ¹⁰Servicio de Cardiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Instituto de Investigación Sanitaria (INCLIVA), Universidad de Valencia, Valencia, Spain, ¹¹Servicio de Oftalmología, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain**Introduction:** Type 2 diabetes mellitus is associated with chronic inflammation and systemic complications, including ophthalmologic manifestations. While blood cytokines serve as inflammatory biomarkers, their expression in tears and correlation with systemic inflammation remain unclear. This study compared cytokine profiles in plasma and tears of well-controlled type 2 diabetes patients and controls, assessing their correlation and potential as biomarkers for disease monitoring.**Materials and methods:** This cross-sectional study included 81 participants [40 with type 2 diabetes without retinopathy (T2DM group) and 41 controls (control group)] from primary care centers. Plasma and tear samples were analyzed using a multiplex immunoassay for 27 cytokines. Data were analyzed using ANCOVA (adjusted for age, hypertension, and dyslipidemia), and correlation analyses.**Results:** Patients in the T2DM group exhibited distinct inflammatory profiles. Plasma levels of IL-2 ($P < 0.05$), IL-7 ($P < 0.05$), IL-9 ($P = 0.001$), and CCL4 ($P < 0.01$) were significantly lower, while tear levels of IL-6 ($P < 0.01$), CXCL8

Artículo 2: Perfil oftalmológico diferencial en Pacientes con enfermedad coronaria arterial coexistente con Diabetes Mellitus tipo 2: Concentraciones elevadas de citoquinas en lágrimas

Article

Differential Ophthalmological Profile in Patients with Coronary Artery Disease Coexisting with Type 2 Diabetes Mellitus: Elevated Tear Cytokine Concentrations

Rafael Jiménez-López ^{1,2,3,†}, José Lorenzo Romero-Trejejo ^{1,3,4,†}, Lourdes Fernández-Romero ¹,
Laura Martín-Chaves ^{1,5,6}, Miguel Romero-Cuevas ^{1,5,6}, Ana Isabel Molina-Ramos ^{1,5,6},
María José Sánchez-Quintero ^{1,5,6}, Mora Murri ^{1,5,7}, Francesco Costa ^{1,5,6,8}, Vicente Bodí ^{6,9},
Mario Gutiérrez-Bedmar ^{1,6,10}, Jorge Rodríguez-Capitán ^{1,5,6,*}, Francisco Javier Pavón-Morón ^{1,5,6,*}
and Manuel Jiménez-Navarro ^{1,3,5,6}



Citation: Jiménez-López, R.; Romero-Trejejo, J.L.; Fernández-Romero, L.; Martín-Chaves, L.; Romero-Cuevas, M.; Molina-Ramos, A.I.; Sánchez-Quintero, M.J.; Murri, M.; Costa, F.; Bodí, V.; et al. Differential Ophthalmological Profile in Patients with Coronary Artery Disease Coexisting with Type 2 Diabetes Mellitus: Elevated Tear Cytokine Concentrations. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 4906. <https://doi.org/10.3390/jcm13164906>

Academic Editor: Juan José Gorgojo-Martínez

Received: 26 July 2024
Revised: 16 August 2024
Accepted: 17 August 2024
Published: 20 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (IBIMA Plataforma BIONAND), 29010 Málaga, Spain; rjimenez89@gmail.com (R.J.-L.); jlromerotrejejo@gmail.com (J.L.R.-T.); lfdezr@gmail.com (L.F.-R.); lauramartinchaves@gmail.com (L.M.-C.); miguel.romero@ibima.eu (M.R.-C.); molinaramos.ana@gmail.com (A.I.M.-R.); mjsquintero@gmail.com (M.J.S.-Q.); moramurri@gmail.com (M.M.); dottfrancescocosta@gmail.com (F.C.); bedmar@uma.es (M.G.-B.); mjimeneznavarro@gmail.com (M.J.-N.)
 - ² Emergency Department, Virgen de la Victoria University Hospital, Campus de Teatinos s/n, 29010 Málaga, Spain
 - ³ Department of Medicine and Dermatology, Faculty of Medicine, University of Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29010 Málaga, Spain
 - ⁴ Ophthalmology Department, Virgen de la Victoria University Hospital, Campus de Teatinos s/n, 29010 Málaga, Spain
 - ⁵ Cardiology and Cardiovascular Surgery Department, Virgen de la Victoria University Hospital, Campus de Teatinos s/n, 29010 Málaga, Spain
 - ⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; vicente.bodi@uv.es
 - ⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red en Fisiopatología de Obesidad y Nutrición (CIBEROBn), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
 - ⁸ Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphological and Functional Imaging, University of Messina, 98122 Messina, Italy
 - ⁹ Cardiology Department, Clinical University Hospital of Valencia, University of Valencia, Instituto de Investigación Sanitaria (INCLIVA), 46010 Valencia, Spain
 - ¹⁰ Department of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29010 Málaga, Spain
- * Correspondence: capijorge@hotmail.com (J.R.-C.); javier.pavon@ibima.eu (F.J.P.-M.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Background/Objectives: Coronary artery disease (CAD) and type-2 diabetes mellitus (T2DM) are characterized by chronic low-grade inflammation. However, measuring cytokines typically involves invasive blood sampling, which can be problematic for CAD patients. This study aimed to assess ophthalmological parameters and tear cytokines in patients with CAD, comparing those with comorbid T2DM to those without to understand their inflammatory profiles. **Methods:** One hundred subjects with suspected chronic or acute CAD were initially included in this single-center cross-sectional study after clinical stabilization. Seventy-two patients with confirmed CAD were divided into two groups: 32 patients with T2DM and 40 patients without T2DM. A total of 144 eyes were examined, and tear fluid samples were collected to determine cytokine concentrations. Ophthalmological parameters and tear concentrations of cytokines were analyzed, controlling for age, sex, and other cardiovascular risk factors. **Results:** Patients with CAD and T2DM exhibited decreased ophthalmological parameters and increased cytokine concentrations in comparison to those without T2DM. Significant inverse correlations between ophthalmological parameters and cytokine concentrations were observed. Following adjustment, a full logistic regression model for distinguishing patients with CAD and comorbid T2DM included macular cube volume, mean macular thickness, interleukin (IL)-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), CCL3, CCL4, and CCL11/eotaxin-1, demonstrating excellent discriminatory power

