



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Tecnología de la
Alimentación y la Nutrición

Efecto del tratamiento anti-VEGF sobre los factores
de riesgo cardiovascular y biomarcadores de estrés
oxidativo en pacientes con degeneración macular
exudativa asociada a la edad

Autora:

Noemí Manresa Ramón

Director/as:

Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero

Dra. D^a. Juana Mulero Cánovas

Dr. D^o Manuel Losada Morell

Murcia, 15 Mayo del 2015



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero, Dra. D^a. Juana Mulero Cánovas y Dr. D^o. Manuel Losada Morel, directores de la Tesis Doctoral titulada “Efecto del tratamiento anti-VEGF sobre factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con degeneración macular exudativa asociada a la edad” realizada por D^a. Noemí Manresa Ramón en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, autorizan su presentación a trámite dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos para dar cumplimiento a los Reales Decretos 56/2005 y 778/1998, en Murcia a 15 de Mayo del 2015.

Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero

Dra. D^a. Juana Mulero Cánovas

Dra. D^a. Manuel Losada Morell

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación
Campus de Los Jerónimos. 30107, Guadalupe (Murcia)
Tno: (+34) 968 27 88 22, Fax: (+34) 968 27 85 78. C.e.: tercerciclo@pdi.ucam.edu

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer y espero nombrar a todas y cada una de las personas que en mayor o menor medida han sido participes para que este sueño, hoy sea una realidad.

Siempre soñé y tuve claro mis metas a nivel profesional y personal, y tras aprobar la plaza para comenzar mi nueva etapa en el hospital como farmacéutica hospitalaria conocí a la Dra. Pilar Zafrilla que me tendió la mano para poder alcanzar mi sueño y me ha dirigido más que a una alumna, como una amiga. Otra gran profesional que quiero destacar ha sido la Dra. Juana Mulero que me ha ayudado durante estos años y me ha brindado esta gran oportunidad. Siempre habéis estado ahí, ayudándome y orientándome.

Al Dr. Manuel Losada del Departamento de Oftalmología, por tu dedicación, tus explicaciones y tu tiempo.

En el momento de decir si quiero comenzar la tesis, me vinieron muchos recuerdos en mi cabeza pero también muchas obligaciones, entre mis recuerdos académicos favoritos están las tardes que me pasaba con mi compañera universitaria (y gran amiga) Salome tomando un café y contándonos nuestros cotilleos, sueños, esperanzas e ilusiones en la cafetería de la universidad de Granada o aquellas tardes interminables en el parque García Lorca. Siempre has sido especial para mí y me has apoyado en todo, y parte de mi merito profesional te lo debo a ti.

Agradecer a toda mi familia destacando a mis dos hermanas que las quiero muchísimo y siempre me han apoyado en cada decisión: Eva (que es la alegría de mi casa, siempre positiva y he vivido muchas aventuras con ella, las cuales siempre las recordaré) y Ana (que es la hermana mayor que todo el mundo quiere tener y destaco de ella su gran instinto protector y siempre me ayuda en todo). También, mi padre que lo amo con locura y siempre me hace ver la parte positiva de las cosas cuando estoy agotada o en mis momentos negativos. Mil gracias.

Al pequeño de la casa, Martín, que cuando lo veo y lo tomo en mis brazos me aporta energía, amor, dulzura...y son sentimientos muy importantes para poder alcanzar las metas y los sueños. Gracias.

Además, agradecer de todo corazón a mi apoyo incondicional que soporta mi carga asistencial de trabajo y de la tesis con una gran sonrisa y siempre me

levanta el ánimo. Todos los días me siento muy afortunada de tenerte a mi lado. Gracias, José.

Y como no, felicitar a mi abuela Carmen por tener ya a una nieta con la tesis... todos los días me pregunta, ¿nena el doctorado qué? Siempre preocupándote por mi educación y por mi vida. Eres un diez de abuela. Gracias, abuelita.

Además, mencionar a mis amigas que siempre han confiado en mí, María, Almudena, Patricia, M^a Jesús, Olga, Lidia.

A todas las personas que se han prestado a participar en dicho estudio, sin ellas esto no habría sido posible. Muchas gracias.

Al ATS Salvador encargado de las extracciones, que siempre estaba dispuesto a primera hora de la mañana.

Al personal del laboratorio de bioquímica del Morales, Arrixaca, UCAM y Quirón.

Por último, destacar a la persona más importante en mi vida, que siempre me recordaba que yo podía con todo, que con tan solo una mirada sabía lo que me quería decir porque entre nosotras sobran las palabras, que me has cuidado y mimado en todas las etapas de mi vida tanto en las buenas como en las malas...por mil cosas más, decirte GRACIAS y te quiero con locura, mamá.

Gracias a todos de todo corazón.

*Cualquier cosa que la mente del hombre puede concebir y creer, puede ser
conseguida*

Napoleon Hill

ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

Comunicaciones a congresos internacionales

- N Manresa-Ramón, J Mulero, P Zafrilla, M Losada, P Selvi-Sabater, I Sánchez-Martínez, MC Sánchez-Mulero, B Arribas-Díaz. **Markers of cardiovascular risk and age related macular degeneration.** European Journal of Hospital Pharmacy, Science and Practice, 19th Congress of the EAHP, Marzo 2014, Barcelona, Spain.
- N. Manresa, J. Mulero, J Sánchez, M Losada, P Zafrilla. **Effect of antiangiogenic treatments on total antioxidant status and antioxidant enzymes in patients with age related macular degeneration.** 14th Congress Euroretina London. Septiembre 2014.
- P. Zafrilla, J Mulero, N Manresa, J Sánchez, M Losada. **Effect of antiangiogenic treatments on biomarkers of oxidative stress in patients with age related macular degeneration.** 14th Congress Euroretina London. Septiembre 2014.

Capítulos de libros

- **Homocysteine and Association of eye disease.** “Homocysteine: Structure, Biosynthesis and Health Implications”. Nova Science Publishers. Abril 2013.
- **Stress Oxidative and Age Related Macular Degeneration.** “Induced Oxidative Stress: Role in Diseases and Biological Effects”. Nova Science Publishers. Abril 2014
- **The effect of anthocyanins about cardiovascular disease risk.** “Anthocyanins: Food Sources, Chemical Applications and Health Benefits”. Nova Science Publishers. Agosto 2014.

Artículos

- J.Mulero, N.Manresa, P.Zafrilla, M.Losada. **Markers of cardiovascular risk in elderly patients with age-related macular degeneration.** Clinical Hemorheology and Microcirculation. 2014.

- N. Manresa, J. Mulero, M. Losada, P. Zafrilla. **Influence of anti-VEGF about cardiovascular biomarkers in age related macular degeneration.** J Nutr Health Aging. 2015; 2; 228-232.
- N. Manresa, J. Mulero, M. Losada, P. Zafrilla. **Effect of pegaptanib and ranibizumab on plasma and vitreous homocysteine in patients with exudative age related macular degeneration.** Retina. 2015 (Aceptado y pendiente de publicación).

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	24
ÍNDICE DE FIGURAS.....	27
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	30
1. INTRODUCCIÓN.....	37
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	44
3.1. ¿QUÉ ES LA DMAE?.....	44
3.2. TIPOS DE DMAE.....	44
3.2.1. No exudativa, atrófica o seca	44
3.2.2. Neovascular, exudativa o húmeda.....	45
3.3. FACTORES DE RIESGO	46
3.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y DMAE.....	48
3.4.1. Rutas y mecanismos de estrés oxidativo asociados a la DMAE... 48	
3.4.1.1. <i>La autofagia y heterofagia.....</i>	48
3.4.1.2. <i>La apoptosis.....</i>	50

3.4.1.3. <i>El hierro</i>	50
3.4.1.4. <i>El ADN</i>	51
3.4.1.5. <i>Antioxidantes</i>	53
3.4.2. Biomarcadores de estrés oxidativo	56
3.4.2.1. <i>Glutación oxidado y reducido</i>	56
3.4.2.2. <i>Determinación de grupos carbonilo, como marcador de la oxidación proteica</i>	57
3.4.2.3. <i>Peroxidación lipídica</i>	57
3.4.2.4. <i>Oxidación del DNA</i>	58
3.5. TRATAMIENTO	59
3.5.1. Tratamiento de la DMAE seca	59
3.5.1.1. <i>Suplementos antioxidantes</i>	59
3.5.1.1.1. <i>Vitaminas antioxidantes y zinc</i>	59
3.5.1.1.2. <i>Carotenoides</i>	60
3.5.1.1.3. <i>Canolol</i>	61
3.5.1.1.4. <i>Melatonina</i>	61
3.5.1.1.5. <i>Complejos vitamínicos con selenio y carotenoides</i>	62
3.5.1.1.6. <i>Lípidos: ácidos grasos omega 3</i>	63
3.5.1.1.7. <i>Resveratrol</i>	64
3.5.1.2. <i>Terapia con láser</i>	64
3.5.2. Tratamiento de la DMAE húmeda	65
3.5.2.1. <i>Tratamiento intravítreo</i>	67
3.5.2.1.1. <i>Ranibizumab</i>	67
3.5.2.1.2. <i>Bevacizumab</i>	68
3.5.2.1.3. <i>Pegaptanib</i>	69
3.5.2.1.4. <i>Aflibercept</i>	69
3.5.2.2. <i>La fotocoagulación con láser térmico</i>	71
3.5.2.3. <i>La terapia fotodinámica</i>	71
3.5.2.4. <i>Inhibidores de VEGF con la terapia adyuvante</i>	72

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	17
<hr/>	
3.5.2.5. <i>Cirugía</i>	72
3.5.2.6. <i>Radioterapia</i>	72
3.5.2.7. <i>Suplementos antioxidantes</i>	73
3.6. HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	73
3.6.1. Concepto y metabolismo de la homocisteína	73
3.6.2. Mecanismos fisiopatológicos	76
3.6.3. Hiperhomocisteinemia y homocistinuria	77
3.6.3.1. <i>Factores desencadenantes de hiperhomocisteinemia</i>	78
3.6.3.2. <i>Factores desencadenantes de homocistinuria</i>	79
3.6.4. Hiperhomocisteinemia y DMAE	80
3.6.5. Hiperhomocisteinemia asociada al déficit de vitaminas y/o folato	81
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
4.1. MUESTRA POBLACIONAL.....	85
4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	88
4.2.1. Análisis de determinados factores de riesgo cardiovascular en pacientes con DMAE exudativa comparado con un grupo control	88
4.2.2. Estudio de la influencia de la terapia anti-VEGF (Ranibizumab y Pegaptanib) sobre determinados marcadores de riesgo cardiovascular y de estrés oxidativo en pacientes con DMAE exudativa	90
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	92
5. RESULTADOS	93
5.1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON DMAE EXUDATIVA.....	97
5.1.1. Metodología de análisis de los factores de riesgo cardiovascular	98

5.1.1.1. Toma de muestras.....	98
5.1.1.2. Parámetros bioquímicos.....	98
5.1.1.2.1. Determinación de lípidos en plasma.....	98
5.1.1.2.1.1. Colesterol total.....	99
5.1.1.2.1.2. Triglicéridos.....	99
5.1.1.2.1.3. Colesterol-HDL.....	100
5.1.1.2.1.4. Colesterol-LDL.....	100
5.1.1.2.2. Homocisteína.....	101
5.1.1.2.3. Proteína C-Reactiva.....	101
5.1.1.2.4. Fibrinógeno.....	101
5.1.2. Perfil lipídico en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control	102
5.1.3. Valores de homocisteína plasmática en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.....	104
5.1.4. Valores de la PCR en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.....	105
5.1.5. Valores del fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.....	107
5.2. EFECTO DE LOS ANTI-VEGF SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON DMAE EXUDATIVA.....	111
5.2.1. Metodología de análisis de los factores de riesgo cardiovascular.....	112
5.2.1.1. Metodología y muestra poblacional.....	112
5.2.1.2. Toma de muestras.....	113
5.2.1.3. Parámetros bioquímicos.....	113
5.2.1.3.1. Determinación de lípidos en plasma.....	113
5.2.1.3.1.1. Colesterol total.....	113
5.2.1.3.1.2. Triglicéridos.....	114
5.2.1.3.1.3. Colesterol-HDL.....	114

5.2.1.3.1.4. Colesterol-LDL.....	115
5.2.1.3.1.5. Apoproteína A.....	115
5.2.1.3.2. Homocisteína.....	116
5.2.1.3.3. Proteína C-Reactiva.....	116
5.2.1.3.4. Fibrinógeno.....	117
5.2.1.4. <i>Efectos adversos</i>	117
5.2.2. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre el perfil lipídico en pacientes con DMAE exudativa.....	117
5.2.3. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la homocisteína en pacientes con DMAE exudativa	119
5.2.4. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la PCR en pacientes con DMAE exudativa	120
5.2.5. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre el fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa	121
5.3. EFECTO DE LOS ANTI-VEGF SOBRE LOS BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON DMAE EXUDATIVA.....	127
5.3.1. Metodología de análisis de los biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con DMAE exudativa.....	129
5.3.1.1. <i>Metodología y muestra poblacional</i>	129
5.3.1.2. <i>Toma de muestra</i>	130
5.3.1.3. <i>Parámetros bioquímicos</i>	131
5.3.1.3.1. Estado total antioxidante.....	131
5.3.1.3.2. Cociente GSH/GSSH.....	132
5.3.1.3.3. Glutación peroxidasa.....	133
5.3.1.3.4. Glutación reductasa.....	134
5.3.1.3.5. Superóxido dismutasa.....	135
5.3.1.3.6. Grupos carbonilos.....	136
5.3.1.4. <i>Efectos adversos</i>	136
5.3.2. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre el TAS en pacientes con	

DMAE exudativa.....	137
5.3.3. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre el cociente GSH/GSSG en pacientes con DMAE exudativa.....	138
5.3.4. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la GPx en pacientes con DMAE exudativa	139
5.3.5. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la GR en pacientes con DMAE exudativa	140
5.3.6. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la SOD en pacientes con DMAE exudativa	141
5.3.7. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre los grupos carbonilos en pacientes con DMAE exudativa	142
5.4. EFECTO DE LOS ANTI-VEGF SOBRE LA HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y EN HUMOR ACUOSO EN PACIENTES CON DMAE EXUDATIVA.....	146
5.4.1. Metodología de análisis de la homocisteína en pacientes con DMAE exudativa.....	148
5.4.1.1. Metodología y muestra poblacional.....	148
5.4.1.2. Toma de muestra.....	149
5.4.1.3. Parámetros bioquímicos.....	150
5.4.1.3.1. Homocisteína plasmática y vítrea.....	150
5.4.1.4. Efectos adversos.....	150
5.4.2. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la homocisteína plasmática en pacientes con DMAE exudativa.....	150
5.4.3. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la homocisteína en humor vítreo en pacientes con DMAE exudativa.....	151
6. CONCLUSIONES.....	156
7. BIBLIOGRAFÍA.....	178

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	<u>21</u>
ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	185
ANEXO 2. COMITÉ DE ÉTICA.....	188

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Síntomas característicos de la DMAE húmeda y seca.....	46
Tabla 2. Clasificación y función de los tipos de VEGF.....	66
Tabla 3. Pruebas diagnósticas para la patología de DMAE exudativa.....	85
Tabla 4. Descripción de la muestra poblacional.....	86
Tabla 5. Marcadores analizados en el grupo de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	90
Tabla 6. Biomarcadores plasmáticos analizados en el grupo de pacientes con DMAE exudativa al inicio y tras 6 meses de tratamiento con pegaptanib y ranibizumab.....	91
Tabla 7. Valores del perfil lipídico de pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.....	103
Tabla 8. Valores de Hcy plasmática en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.....	105
Tabla 9. Valores de la PCR en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.....	106
Tabla 10. Valores de fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.....	108
Tabla 11. Valores del perfil lipídico en pacientes con DMAE exudativa antes y después del tratamiento con Pegaptanib y Ranibizumab.....	118
Tabla 12. Valores de homocisteína plasmática en pacientes con DMAE exudativa antes y después del tratamiento con Pegaptanib y Ranibizumab.....	120
Tabla 13. Valores de PCR en pacientes con DMAE exudativa antes y después del tratamiento con Pegaptanib y Ranibizumab.....	121

Tabla 14. Valores del fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa antes y después del tratamiento con Pegaptanib y Ranibizumab.....	122
Tabla 15. Marcadores analizados en el estudio de estrés oxidativo.....	130
Tabla 16. Población de pacientes con DMAE y grupo control del estudio de antioxidantes y biomarcadores de estrés oxidativo.....	131
Tabla 17. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre TAS de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	138
Tabla 18. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre el cociente GSH/GSSH de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	139
Tabla 19. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre la GPx de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	140
Tabla 20. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre la GR de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	141
Tabla 21. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre SOD de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	142
Tabla 22. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre grupos carbonilo de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	143
Tabla 23. Población de pacientes con DMAE y grupo control del estudio de homocisteína plasmática e invitreo.....	149
Tabla 24. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre la Hcy plasmática de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	151
Tabla 25. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre la Hcy en humor vítreo de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.....	152

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo metabólico del glutatión.....	57
Figura 2. La vía de la metionina y metabolismo de la Hcy, con representación de rutas completas, transferencia y eliminación.....	74
Figura 3. Patogénesis de la hiperhomocisteinemia.....	77
Figura 4. Esquema de la muestra poblacional de los estudios planeados....	88
Figura 5. Figura A. Equilibrio entre ROS (especies reactivas de oxígeno) y los agentes antioxidantes (AOX). B. Desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los agentes antioxidantes (AOX) que se produce en los pacientes con DMAE.....	127
Figura 6. Intervención de la homocisteína en el proceso aterotrombótico	146

SIGLAS Y ABREVIATURAS

SIGLAS Y ABREVIATURAS

Números

2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihidro-clorido (AAPH)

2-(yodofenil)-3(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T.)

8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo G)

19 AEPR (un pigmento retiniano humano línea celular epitelial)

A

Ácido eicosapentaenoico (EPA)

Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS)

Agencia europea de medicamentos (EMA)

Anticuerpo anti-Proteína C-Reactiva (AbPR)

Apolipoproteína A (Apo A)

Astaxantina (AST)

C

CARMA (carotenoides en el maculopatía relacionada con la edad)

Cistationina B-sintetasa (CBS)

Colesterol esterasa (CE)

Colesterol oxidasa (CO)

D

Degeneración macular relacionada con la edad (DMAE)

Dinitrofenihidracina (DNP)

Ditiotreitol (DTT)

Docosahexaenoico (DHA)

E

Endotelial sintasa NO (eNOS)

Estado Antioxidante Total (TAS)
Estudio de enfermedades oculares (AREDS)
Estudio de enfermedades oculares casos-controles (EDCCS)
Epitelio pigmentario de retina (EPR)
Especies de radicales de oxígeno (ROS)

F
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
Factor nuclear eritroide 2 (Nrf2)
Flavín adenín dinucleotido (FAD)
Fluoresceína (FL)

G
Glicerol fosfato oxidasa (GPO)
Glicerol kinasa (GK)
Glutación oxidado (GSSG o GSSH)
Glutacion peroxidasa (GPx)
Glutación reducido (GSH),
Glutacion reductasa (GR)

H
Hiperhomocisteinemia (hHcy)
Homocisteína (Hcy)

L
Lipoproteína de alta densidad (HDL)
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)
Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL)

M
Malondialdehído (MDA)
Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)
Metionina sintetasa (MS)

N
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)
N-metil-D-aspartato (NMDA)

P
Paraoxonasa 1 (PON1)

PEG-colesterol esterasa (PEG-CE)

Peroxidasa (PO)

Polietilenglicol (PEG)

Proteína C reactiva (PCR)

Proteínas quinasas activadas por mitógenos (JNKs)

R

Retículo endoplasmático (ER)

Riesgo cardiovascular (RCV)

S

SAH (S-adenosil-L- Hcy)

Señal de quinasa extracelular regulada (ERK)

SERV (Sociedad Española de Retina y Vítreo).

Subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT)

Superóxido-dismutasa (SOD)

T

Termoterapia transpupilar (TTT)

Tiempo de protrombina (PT)

Transductor de señal y activador de la transcripción-3 (STAT3)

Tomografía de coherencia óptica (OCT)

U

Universidad Católica San Antonio (UCAM)

X

Xatin oxidasa (XOD)

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la causa de ceguera más común en los países desarrollados. Hay dos tipos principales de DMAE: atrófica y neovascular. La DMAE neovascular, húmeda o exudativa es alrededor del 15% de todos los casos de DMAE, caracterizándose por la presencia de las membranas neovasculares coroidales (neovascularización ocular) pudiendo causar la pérdida total de la visión. El desarrollo de los vasos neovasculares puede provocar complicaciones graves como la hemorragia vítrea, formación de tejido fibrovascular y desprendimientos de retina. La mácula es altamente susceptible al estrés oxidativo porque contiene alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, alto consumo de oxígeno y gran exposición a la luz visible. La DMAE exudativa ha sido vinculada a la tensión generada por las especies de radicales de oxígeno (ROS) en las células fotorreceptoras maculares y las células del epitelio pigmentario de la retina.

Las ROS son capaces de activar las vías de señalización que eventualmente promueven la regeneración y el crecimiento celular. En presencia de una neovascularización anormal, los mecanismos de defensa del estrés oxidativo ya no son adecuados y causan la muerte celular. Esta muerte celular en la región de intraretinal vascular se asocia con un aumento de la presencia de biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo. Los ROS están implicados, ya sea directa o indirectamente en el proceso de la angiogénesis fisiológica y patológica de la DMAE exudativa. La administración de antioxidantes mejora las vías de regulación de las ROS y el equilibrio oxido-reducción contribuyendo a una mejoría clínica de los pacientes. Por tanto, una herramienta clínica para determinar el grado de evolución de la DMAE exudativa y si la terapia aplicada está siendo efectiva, es la determinación analítica de biomarcadores de estrés oxidativo.

Además de la patogenia del estrés oxidativo en la DMAE exudativa, es importante conocer el papel del riesgo cardiovascular debido a la posible

asociación de DMAE y riesgo cardiovascular.

Entre los posibles biomarcadores de riesgo cardiovascular, destacamos el valor pronóstico de la homocisteína ya que es capaz de desarrollar múltiples funciones que afectan a la retina, entre las cuales destacamos: actividad mitogénica, aumento del daño oxidativo, disminución de la perfusión coroidea, cambio de estructura proteica y pérdida de su función, y aumento de apoptosis celular. Aunque hay que tener en cuenta el resto de biomarcadores de riesgo cardiovascular como el perfil lipídico, el fibrinógeno o la PCR, es decir, no hay que interpretar un biomarcador de forma aislada sino el contexto global del paciente.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) está asociado a la neovascularización. Existen fármacos administrados vía intravítrea (pegaptanib, ranibizumab y bevacizumab) que apuntan específicamente al bloqueo de VEGF y se ha convertido en el tratamiento estándar para la DMAE exudativa en un intento de tratar estos trastornos vasculares. Actualmente, muchos laboratorios están investigando fármacos en el campo acerca de VEGF. Las terapias anti-VEGF han demostrado ser eficaces en la pérdida de la visión de enfermedades retinianas desarrolladas por procesos neovasculares. Sin embargo, la inhibición de VEGF puede perturbar el mantenimiento homeostático de la vasculatura normal y de las ROS. Además, algunos investigadores plantearon la hipótesis de que el VEGF juega un papel en el mantenimiento y la función de la retina de adultos y que la terapia con anti-VEGF pueden anular la neuroprotección mediada por VEGF. ¿Cómo incide el tratamiento con anti-VEGF en el equilibrio oxido-reducción? Por otra parte, algunos datos clínicos recientes han indicado que la inhibición de VEGF sistémica acelera la aterogénesis, induce la vasoconstricción y la reducción de la síntesis de óxido nítrico sugiriendo que los fármacos anti-VEGF podrían aumentar el riesgo cardiovascular de los pacientes con DMAE exudativa. Finalmente, existe un riesgo teórico de acontecimientos tromboembólicos arteriales de la terapia con anti-VEGF, incluido el accidente cerebrovascular y el infarto de miocardio, debido a la inhibición del papel de VEGF.

¿Podríamos monitorizar la terapia anti-VEGF con biomarcadores cardiovasculares? ¿Aumenta el riesgo de los pacientes con DMAE exudativa tras la administración continuada de fármacos anti-VEGF vía intravítrea?

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el riesgo cardiovascular y el estrés oxidativo en pacientes con degeneración macular exudativa asociada a la edad y analizar el efecto de la terapia anti-VEGF (ranibizumab y pegaptanib) sobre biomarcadores de estrés oxidativo y factores de riesgo cardiovascular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar un análisis de determinados factores de riesgo cardiovascular (perfil lipídico, homocisteína, proteína C reactiva, fibrinógeno) y de inflamación (homocisteína y proteína C reactiva) a pacientes con DMAE exudativa, comparados con un grupo control.
- II. Analizar el efecto de la terapia intravítrea anti-VEGF durante seis meses (pegaptanib o ranibizumab) en pacientes con DMAE exudativa sobre los factores de riesgo cardiovascular mencionados anteriormente
- III. Analizar el estado antioxidante y determinados biomarcadores de estrés oxidativo de pacientes con DMAE exudativa, comparando los resultados con los observados con un grupo control y determinar el efecto del tratamiento anti-VEGF (pegaptanib o ranibizumab) durante seis meses sobre estos parámetros.
- IV. Analizar el efecto del tratamiento anti-VEGF (pegaptanib o ranibizumab) sobre los niveles de homocisteína en plasma y en vítreo en pacientes con DMAE exudativa y comparar los resultados con un grupo control.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. ¿QUÉ ES LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD?

La retina es la capa más externa del ojo, su función es transformar las señales luminosas en eléctricas (fototransducción) que se envían al cerebro. La mácula lútea se localiza en el centro de la retina y debe su nombre a la mayor concentración de pigmentos xantófilos, es especial luteína, que le confiere un color amarillento. Es la parte de la retina donde hay mayor densidad de conos, lo que proporciona la mayor agudeza visual que permite al ojo percibir detalles finos y pequeños.

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad que se caracteriza por la aparición de alteraciones degenerativas progresivas en el área macular.

La DMAE es un importante problema de salud pública y una de las principales causas de discapacidad visual irreversible y ceguera en adultos en los países industrializados. En Estados Unidos afecta a 1.75 millones de personas, y se prevé un aumento del 50% en 2020 debido al envejecimiento de la población^{1,2}. Aproximadamente, una de cada tres personas mayores de 75 años estará afectada de DMAE³.

3.2. TIPOS DE DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD

3.2.1. DMAE no exudativa, atrófica o seca

Es la forma más frecuente (85%). Se caracteriza por placas de atrofia en el epitelio pigmentario de la retina (EPR), las cuales van precedidas por la presencia de pequeños depósitos amarillos bajo la retina llamados drusas. Generalmente tiene una evolución lenta y poco efecto sobre la visión sino se desarrolla una atrofia importante.

3.2.2. DMAE neovascular, exudativa o húmeda

Ocurre sólo en aproximadamente el 10% de las personas con DMAE (es menos frecuente pero más agresiva). Se produce por el crecimiento de nuevos vasos anormales y muy frágiles denominándose este proceso “neovascularización coroidea”. La anormal permeabilidad de los nuevos vasos favorece el sangrado y la acumulación de líquido intrarretiniano (edema). Esta forma de degeneración macular causa la mayor parte de la pérdida de la visión asociada con la enfermedad.

La forma atrófica progresa lentamente (90% de todos los casos) y junto con la DMAE neovascular o exudativa son responsables del 88% de todos los casos de ceguera atribuible a la DMAE^{4,5}. Además, 7,3 millones de personas tienen DMAE precoz, que por lo general se asocia con poca o ninguna pérdida de la visión, pero aumenta el riesgo de desarrollar DMAE avanzada⁶.

Sintomatología

Al inicio de la enfermedad el paciente puede no presentar síntomas, pero la evolución de la enfermedad puede ocasionar alteraciones en la visión central.

La DMAE seca o atrófica presenta como síntoma más común la visión borrosa.

La DMAE neovascular puede presentar hemorragia subretiniana, fluido intrarretiniano, lípidos y/o líquido subretiniano en la mácula. Además, puede llegar a causar desprendimientos del EPR siendo exudativos, hemorrágicos o ambos⁷. La DMAE neovascular se caracteriza por una neovascularización coroidea, que por lo general afecta a la fovea y las alteraciones visuales que pueden manifestarse son visión borrosa, metamorfopsia (distorsión de la imagen) o la presencia de manchas negras en el campo visual central (escotoma). El principal síntoma de la DMAE húmeda es que las líneas rectas aparecen torcidas y onduladas⁸.

En la tabla 1 se observan los síntomas clínicos más característicos para diferenciar las formas de DMAE.

Tabla 1. Síntomas característicos de la DMAE húmeda y seca. (Novak 2006) ⁸

DMAE SECA	DMAE HÚMEDA
Pérdida progresiva de agudeza visual	Pérdida brusca y progresiva de agudeza visual
Dificultad para la lectura.	Escotoma central
Metamorfopsia	Dificultad para la lectura
Drusas	Metamorfopsia
Dispersión de pigmento	Hemorragia sub/intraretiniana
Atrofia y degeneración del EPR	Atrofia subfoveal
	Desprendimiento exudativo y EPR
	Exudados lipídicos

EPR: epitelio pigmentario de retina.

3.3. FACTORES DE RIESGO

Desde la perspectiva de la salud pública es importante la identificación de pacientes con alto riesgo de DMAE, sobre todo de DMAE neovascular, ya que facilitaría la detección de la enfermedad antes de la aparición de la pérdida irreversible de la visión.

En una revisión sistemática y meta-análisis se evaluaron 16 factores de riesgo y se observó que la edad, el tabaquismo, la cirugía de cataratas y los antecedentes familiares presentaban una mayor relación con la DMAE⁹.

Edad: En un estudio epidemiológico realizado en la población española con DMAE, se observó que a mayor edad mayor riesgo de desarrollar DMAE (se observó un aumento de 1,3% en los individuos de edades comprendidas entre 65-74 años y un aumento del 8,5% en individuos con edades ≥ 80 años)¹⁰.

Tabaquismo: Myers y cols.¹¹ determinaron la incidencia durante un periodo de 20 años de DMAE precoz en pacientes fumadores siendo del 24,4% y

la incidencia de DMAE tardía fue del 4,5%. El tabaco y un mayor número de años-paquete fumados aumentan el riesgo de la progresión de la DMAE¹¹.

Cirugía: La relación entre la cirugía de catarata y la DMAE podría reflejar factores de riesgo comunes ya que ambas son enfermedades que afectan al ojo envejecido. Existen indicios de que la cirugía pueda predisponer al ojo operado a desarrollar una DMAE neovascular^{9,12}.

Antecedentes familiares: se están investigando los genes específicos relacionados con la enfermedad pero existe una predisposición genética siendo un tema muy complejo y que continúa en estudio. Un ejemplo de las alteraciones genéticas se sitúa en la proteína del factor H del complemento. Esta proteína está involucrada en la regulación del sistema inmunitario y se ha localizado un cambio de tirosina por histidina provocando la disminución de la actividad del complemento y aumento del desarrollo de DMAE¹³⁻¹⁵. Otro ejemplo es la apolipoproteína E, parece que podrían tener un efecto protector¹⁶. Hay otros estudios que proporcionan evidencias del papel que los polimorfismos genéticos podrían desempeñar en el desarrollo de la DMAE.

Otros factores de riesgo con una menor consistencia de asociación son el índice de masa corporal (IMC), la hipertensión, antecedentes de enfermedad cardiovascular y los niveles de fibrinógeno plasmático.

Todos estos factores están asociados con la enfermedad cardiovascular y se controlan en el ámbito de la atención hospitalaria y primaria. En el apartado 5.1 se explica la asociación entre los factores de riesgo cardiovascular y la DMAE.

Los factores nutricionales son muy importantes ya que los suplementos con antioxidantes son parte de la terapia tanto preventiva como de tratamiento. Los pacientes con déficit nutricional presentan mayor riesgo de incidencia de DMAE. Ittly y cols.¹⁷ observaron que pacientes con niveles plasmáticos medios o bajos de 25-hidroxi-vitamina D y déficit de vitamina D en la dieta presentaban mayor prevalencia de DMAE exudativa.

Finalmente, podemos indicar que existen muchos factores de riesgo relacionados con la DMAE y algunos podemos modificarlos para disminuir el riesgo de desarrollar DMAE en el futuro.

3.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y DMAE

El mecanismo patogénico de la DMAE es poco conocido, pero numerosos estudios han relacionado niveles elevados de estrés oxidativo en las células maculares fotorreceptoras (conos y bastones) y en el EPR adyacente como factores causales en el desarrollo de la DMAE.

El estrés oxidativo se produce cuando los niveles de oxidantes exceden los niveles de antioxidantes promoviendo la oxidación de componentes celulares y la consiguiente pérdida de la función celular. La producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) es estimulada por distintos factores, tales como la irradiación, el envejecimiento, la inflamación, el aumento de la presión parcial de oxígeno y los contaminantes del aire¹⁸.

3.4.1. Rutas y mecanismos de estrés oxidativo asociados a la DMAE

El estrés oxidativo es un proceso patológico producido por una alteración de los mecanismos bioquímicos que controlan las reacciones de oxidación-reducción. Se produce por la ruptura del equilibrio entre la producción y la eliminación de ROS.

El estrés oxidativo no es un fenómeno aislado, sino que está asociado a determinados eventos como la agregación proteica y vías inmunológicas. El conjunto de todo ello está asociado a la patogénesis de la DMAE.

A continuación, se explican las rutas implicadas en el estrés oxidativo relacionadas con la DMAE.

3.4.1.1. *La autofagia y heterofagia*

El EPR constituye la capa más externa de la retina, y tiene funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis del ojo. El EPR se encuentra bajo la presión constante de las altas demandas metabólicas provocando niveles elevados de estrés oxidativo.

Los segmentos externos de los fotorreceptores están enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados, que pueden sufrir peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica es mayor en la mácula y aumenta con factores como la edad

y la luz ultravioleta¹⁹.

La lipofuscina es un generador fotoinducible de ROS que pueden comprometer la integridad lisosomal, inducir la peroxidación lipídica, reducir la capacidad fagocítica y causar la muerte celular. Los gránulos de lipofuscina están continuamente expuestos a luz visible y ante una tensión superior de oxígeno en la macula causan la producción de ROS.

La autofagia y heterofagia son mecanismos de eliminación de la lipofuscina y ayudan a evitar la acumulación de la misma. En la DMAE, se ha observado una acumulación de lipofuscina por alteración en los mecanismos de eliminación y por tanto, contribuye a la formación de drusas y dispersión del pigmento²⁰. Además, otro mecanismo que contribuye en la eliminación es el alto porcentaje de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox). La concentración elevada de LDL-ox reduce la degradación de los fotorreceptores fagocitados a través de autofagia y heterofagia, aumentando el estrés celular en el EPR²¹. En las pruebas inmunológicas, los fosfolípidos oxidados en la retina estimulan a moléculas quimiotácticas, que reclutan monocitos causando un proceso inflamatorio. Las células apoptóticas, si no se eliminan rápidamente, sufren necrosis y estimulan el sistema inmune innato. Por lo tanto, existe una fuerte relación entre el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en la patología de la DMAE.

Un desequilibrio entre la generación (LDL-ox y lipofuscina) y la supresión de ROS puede conducir a efectos indeseables, por ejemplo: capacidad modificadora de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos^{22,23}. Además, la modificación de la estructura de las proteínas no se han podido relacionar con la etapa de la DMAE (es independiente al grado de DMAE) o con la región de la retina. Esta alteración a nivel de lípidos, proteínas o ácidos nucleicos provoca una alteración de la función de un orgánulo y como consecuencia de ello, hay una estimulación de la actividad metabólica y aumento de la muerte celular²⁴.

La α B/A1-cristalina es un componente lisosomal que se encuentra en el EPR y tiene un papel clave en la regulación de la autofagia (eliminación de los ROS). Las propiedades de esta molécula son la activación de la autofagia, contribuyendo a la reducción del estrés oxidativo y también, ha demostrado propiedades antiapoptóticas. En la DMAE se ha observado que α B/A1-cristalina

se expresa en la etapa tardía de la enfermedad para combatir la progresión de la enfermedad. Por tanto, el déficit de α B/A1-cristalina sensibiliza a las células del EPR y otras células frente al estrés externo, y la sobreexpresión protege al EPR frente al estrés inducido por la apoptosis celular^{25,26}.

En conclusión, los procesos de eliminación de lipofuscina y la adecuada regulación mediante α B/A1-cristalina son mecanismos importantes para prevenir el estrés oxidativo.

3.4.1.2. *La apoptosis*

Los mecanismos específicos implicados en el estrés del retículo endoplasmático inducido por la apoptosis no están claros.

La evidencia disponible sugiere que la inducción transcripcional de CHOP (proteína pro-apoptótica) es fundamental para el estrés del ER. La sobreexpresión de CHOP puede conducir a la detención del ciclo celular y la activación de la cascada de caspasas desarrollando la apoptosis celular. Por tanto, la proteína CHOP disminuye la proteína antiapoptosis como Bcl-2, y aumenta la apoptosis de las células.

Chen et al.²⁷ observaron que la inactivación de CHOP por terapias farmacológicas o genéticas atenuaba la apoptosis de las células del EPR y mejoraba la clínica de la DMAE.

Las mitocondrias son reguladoras centrales de la apoptosis. De hecho, los cambios mitocondriales incluyendo la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo c, y la activación de la caspasa 9 y la caspasa 3 se han asociado con el estrés del ER²⁸.

Por otra parte, la expresión de la α B/A1-cristalina (ya comentada en el apartado anterior) controla la apoptosis celular y proporciona la protección en la función mitocondrial y estos dos procesos disminuirían el riesgo de desarrollar la DMAE^{25,26}.

3.4.1.3. *El hierro*

El hierro puede ser una fuente importante de estrés oxidativo en la DMAE por estimular la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica puede ser

estimulada además por el oxígeno, el ozono y por radicales halógenos.

El hierro es un generador de radicales libres que causa toxicidad en los fotorreceptores y en el EPR. Mientras que el mecanismo de la acumulación de hierro en la DMAE es desconocido, es bien conocida su relación con procesos inflamatorios, la hipoxia y el estrés oxidativo, factores que contribuyen a la patogénesis de la DMAE. Una de las causas de la acumulación del hierro es el envejecimiento o la enfermedad denominada siderosis ocular.

En un estudio post-mortem²⁹ se observaron mayores niveles de hierro en la retina de pacientes con DMAE cuando se compararon con donantes sanos de la misma edad. Se ha observado que la quelación de hierro protege a los fotorreceptores y al EPR en una variedad de modelos de ratón, pudiendo ser un potencial terapéutico para prevenir o tratar a pacientes con DMAE.

La inflamación puede aumentar los niveles séricos de hierro a través de la regulación de la interleucina 6 (IL-6) mediada por la hepcidina. Además, la molécula *Bmp6* es crucial para la regulación de la homeostasis del hierro, y en el estrés oxidativo se han observado bajos niveles de *Bmp6*. En un estudio post-mortem, los EPR de pacientes con DMAE precoz mostraron una disminución de los niveles de *Bmp6* contribuyendo a un aumento de hepcidina y por tanto, aumento de la inflamación y produciendo la acumulación de hierro en la DMAE³⁰.

3.4.1.4. El ADN

La DMAE presenta un proceso poligénico complejo produciéndose por alteraciones acumulativas en la actividad de numerosos genes en diversos tejidos. Se necesitan nuevos avances en biología molecular para comprender la patogénesis e identificar nuevas dianas terapéuticas y de diagnóstico.

Los genes que están implicados en vías asociadas a la DMAE son los reguladores de la respuesta inmune, la inflamación, la apoptosis, la homeostasis del Ca^{2+} y el estrés oxidativo^{31,32}. A continuación, hablaremos de los más representativos.

El estrés oxidativo puede estar asociado con muchos tipos de daño en el ADN, incluyendo roturas de una sola hebra y del doble filamento o modificaciones oxidativas de las bases de ADN. Por ejemplo, la 8-oxo-7,8-

dihidroguanina (8-oxo G) es un marcador de daño oxidativo del ADN y un componente promutagénico en el estrés oxidativo³³. Lau et al³⁴ observaron niveles superiores de 8-oxo G en el humor acuoso de pacientes con DMAE exudativa.

A nivel enzimático, se ha confirmado que la baja síntesis de enzimas encargadas de la reparación del ADN en el EPR y las coroides contribuye a la disfunción retiniana. Los linfocitos de los pacientes con DMAE mostraron una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno y a la radiación ultravioleta, y repararon las lesiones inducidas por estos agentes con menos eficiencia que las células correspondientes de los individuos control^{35,36}.

Se ha observado una menor expresión de las enzimas antioxidantes, causando un mayor daño oxidativo en las proteínas y en los lípidos. El aumento del estrés oxidativo y la acumulación de moléculas dañadas por oxidación conducen a la disfunción de diversas vías metabólicas y de señalización; lo que a su vez, causa la muerte de las células de la retina o una alteración en su función³¹.

La proteína p53 tiene la capacidad de detener la proliferación y la muerte celular por apoptosis. Gallego-Pinazo et al³⁷ utilizaron ratones genéticamente manipulados para una copia extra del gen p53 (transgénicos super p53) frente a ratones controles para investigar la generación de ROS y la actividad antioxidante en el nervio óptico en relación con la disponibilidad de p53. Estos autores observaron un aumento de la actividad antioxidante y un incremento de la síntesis de óxido nítrico en los nervios ópticos de los ratones p53 súper transgénicos en comparación con los ratones controles. La presencia de una copia extra del gen p53 se correlacionó con el estado redox en el nervio óptico de los ratones³⁷.

Otro ejemplo es el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), que sirve como regulador de una respuesta antioxidante coordinada en todos los tipos de células. Sachdeva et al³⁸ relacionaron el envejecimiento del EPR con la señalización alterada del Nrf2 y propone al Nrf2 para estrategias terapéuticas futuras.

Finalmente, las enzimas de regulación y antioxidantes juegan un papel clave en el desarrollo de la DMAE y pueden ser futuras terapias en esta enfermedad ocular (gen p53 y factor Nrf2).

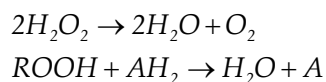
3.4.1.5. Antioxidantes

Para combatir los efectos negativos de las ROS, las células han desarrollado una red de defensa antioxidante intrínseca formada por enzimas como la catalasa, la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidada (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD).

- *Catalasa*

La catalasa es una enzima hemoproteica, que se caracteriza por poseer una estructura tetramérica, en la cual cada subunidad contiene un grupo Hemo (Fe^{3+}). Está presente en la mayoría de las bacterias aerobias estrictas, facultativas y anaerobias aerotolerantes. Esta enzima se encuentra en todos los seres vivos y es necesaria para desintoxicar el peróxido de hidrógeno que se produce durante el metabolismo celular. Generalmente los microorganismos que carecen de citocromos, también carecen de catalasa, así la mayoría de las bacterias anaerobias no la poseen.

La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a una molécula de agua y a una de oxígeno. La catalasa por un lado, cataliza la reducción de peróxido en agua, y por otro lado, oxida los donantes de grupos de hidrógeno, como el metanol y el etanol, con el consumo de un mol de peróxido. Esta enzima presenta actividad catalítica y peroxidica.



- *Glutathion reductasa*

La glutatión reductasa (GR) es una flavoproteína-NAPDH-dependiente que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), en presencia de NAPDH formado en la ruta de las pentosas fosfato como dador de electrones.

La GR permite mantener las concentraciones de GSH en la célula para que pueda ser utilizado por la glutatión peroxidasa (GPx) en la eliminación del H_2O_2 . El GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C y E, las cuales participan en la eliminación de radicales libres generados in situ o a distancia. Además, el GSH interviene en la destoxificación de compuestos xenobióticos, el

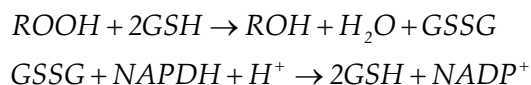
almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular.

La alteración de la actividad de la GR produce la disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno. Dicha alteración se ha observado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del estrés oxidativo.

- *Glutation peroxidasa*

La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima antioxidante presente en todos los tejidos. Existen dos isoenzimas: una isoenzima selenio-dependiente y otra con acción independiente.

Esta enzima cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos orgánicos a agua y alcohol, respectivamente. Para ello utiliza el GSH como donante de electrones.



La alteración de la actividad de la GPx provoca un aumento de los niveles de H₂O₂ y de lipoperóxidos, responsables del daño celular y por tanto estar implicada en la aparición de enfermedades y procesos fisiológicos.

- *Superóxido-dismutasa*

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido, convirtiéndose en la primera barrera defensiva frente a este. Existen tres isoenzimas, cada una de ellas ligada a un grupo prostético diferente: una se asocia con el cobre y el zinc (Cu-Zn-SOD), y las dos restantes con hierro y manganeso (Fe-SOD, Mn-SOD).

La SOD elimina el radical superóxido convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno. En presencia de hierro libre puede presentar una acción pro-oxidante, por lo que tiene que complementar su acción con otros antioxidantes como la GPx y la catalasa que eliminan el peróxido generando oxígeno y agua.

Las alteraciones genéticas, la deficiencia en la dieta de suplementos antioxidantes, la exposición a agentes nocivos (por ejemplo, fumar) aumenta el

daño oxidativo en el EPR y predispone al desarrollo de la DMAE.

En la DMAE, los niveles de las enzimas antioxidantes están disminuidas, pero además, se han encontrado disminuidas otras enzimas como las: metalotioneínas (proteínas reactivas de fase aguda que eliminan los radicales hidroxilo), hemo oxigenasa-1 y hemo oxigenasa-2 (implicadas en el catabolismo del grupo hemo con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes).

Una enzima muy importante es la paraoxonasa 1 (PON1), una esterasa dependiente de calcio, que está estrechamente asociada a la lipoproteína de alta densidad (HDL). PON1 circula en plasma unida a las HDL, y se relaciona con la arteriosclerosis y la enfermedad cardiovascular por su capacidad de hidrolizar los fosfolípidos oxidados presentes en las LDL, asociándose a los efectos beneficiosos o ateroprotectores de las HDL.

PON1 muestra actividad tiolactonasa frente al metabolito tóxico de la homocisteína (Hcy), involucrado en patologías cardiovasculares, lo que podría contribuir a la desintoxicación y mejoría cardiovascular. Orhan et al³⁹ observaron que los pacientes con DMAE exudativa tenían concentraciones de Hcy significativamente mayores cuando se comparaban con los valores observados en un grupo control. Los niveles de Hcy elevados se correlacionaron con una reducción de la actividad PON 1, por lo tanto se produce una acumulación de metabolitos y aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares y desarrollo de DMAE.

Las enzimas son una diana terapéutica para el tratamiento de la DMAE y muchos laboratorios están investigando fármacos en este campo. Un ejemplo son las proteínas quinasas activadas por mitógenos (JNKs). Las JNKs regulan procesos celulares como la proliferación celular, la migración, la supervivencia y la producción de citoquinas. Se activan en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias, componentes microbianos, y componentes derivados del estrés oxidativo. La deficiencia de JNK1 o su inhibición disminuye todos los procesos mencionados y la expresión de VEGF reduciendo la neovascularización que es el proceso clave en el desarrollo de DMAE exudativa⁴⁰.

En el apartado de tratamiento preventivo se explicarán los suplementos antioxidantes utilizados en el tratamiento de la DMAE.

3.4.2. Biomarcadores de estrés oxidativo

3.4.2.1. Glutación oxidado y reducido

El glutatión es un tripéptido no proteínico que se deriva de los aminoácidos. Contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato.

Puede encontrarse en dos formas diferentes según su estado de oxidoreducción: como glutatión reducido (GSH) o como glutatión oxidado (GSSG). La proteína selenocisteína glutatión peroxidasa cataliza reacciones de reducción, en las cuales el grupo SH libre actúa como donador de electrones y, por lo tanto, forma un enlace de puente disulfuro con un segundo GSH (GSSG). La regeneración de la forma oxidada tiene lugar en una reacción dependiente de NADPH mediante la glutatión reductasa. El glutatión es un efector significativo de los sistemas de protección antioxidantes. La relación glutatión reducido (GSH)/ glutatión oxidado (GSSG) se utiliza como medida de la toxicidad celular (Figura 1).

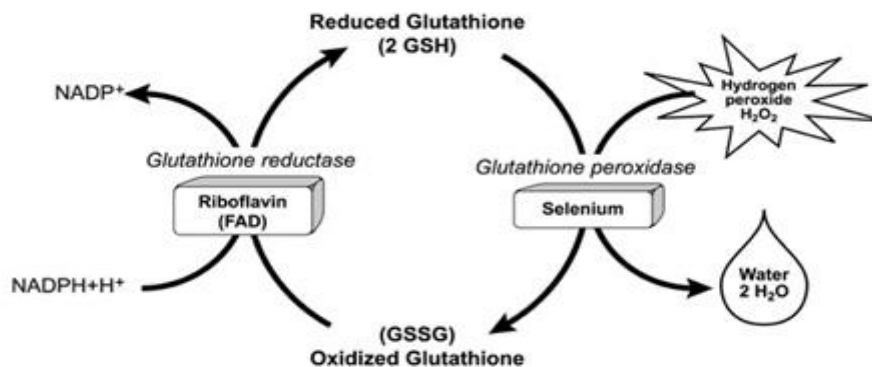


Figura 1: Ciclo metabólico del glutatión. (Bioquímica, Werner Müller-Esterl 2008)

El glutatión está implicado en numerosas funciones: protege a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, además interviene en múltiples procesos celulares incluyendo la diferenciación, la

proliferación celular y la apoptosis.

El estado de oxidación del glutatión, así como los niveles plasmáticos, dependen de diversos factores, heredados o adquiridos, en los que intervienen enzimas, transportadores, moléculas de señalización y factores de transcripción.

La deficiencia de GSH aumenta la susceptibilidad a las ROS, causando daño celular, relacionado con numerosas patologías. Niveles de GSH bajos disminuyen la capacidad antioxidante de las células y por el contrario, cuando aumentan las concentraciones en plasma se incrementa la capacidad antioxidante y la resistencia al estrés oxidativo. Algunas de las alteraciones en el equilibrio del GSH pueden estar implicadas en la generación o en la progresión de gran número de enfermedades⁴¹.

3.4.2.2. *Determinación de grupos carbonilo, como marcador de la oxidación proteica*

El daño oxidativo a las proteínas tiene una química muy compleja. Los sistemas generadores de radicales libres producen la formación de numerosos grupos carbonilo y otras alteraciones en diferentes proteínas.

Los residuos de aminoácidos azufrados, así como los de lisina e histidina son los más susceptibles al daño oxidativo. En los primeros, se generan disulfuros que pueden ocasionar el establecimiento de puentes covalentes cruzados entre proteínas o subunidades con la formación de agregados. En los segundos, se produce su oxidación a grupos aldehídos, esto da lugar a un incremento de grupos carbonilo en las proteínas oxidadas. En los casos extremos llega a producirse la fragmentación de las cadenas polipeptídicas⁴².

Un método para cuantificar el daño oxidativo en proteínas es la determinación de grupos carbonilo⁴².

3.4.2.3. *Peroxidación lipídica*

Los ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico, ácido linolénico y el ácido araquidónico) son las biomoléculas más sensibles al ataque de los ROS debido a la presencia de sus dobles enlaces conjugados. Esta alteración oxidativa se denomina peroxidación lipídica, y resulta especialmente relevante cuando se afectan los lípidos constitutivos de las membranas biológicas. Esta alteración de la membrana provoca la alteración de sus propiedades: la fluidez, el potencial y la

permeabilidad iónica de la membrana dando lugar a una pérdida de la integridad de la misma⁴³.

Los productos de la oxidación lipídica pueden alterar proteínas funcionales como transportadores y enzimas, provocando roturas que liberan el contenido de las células y sus orgánulos, como las enzimas hidrolíticas lisosomales^{44,45}. Otras acciones de los peróxidos lipídicos y/o sus derivados carbonílicos citotóxicos pueden ser el bloqueo de macrófagos, la inhibición de la síntesis proteica, la destrucción bacteriana, la activación enzimática, la agregación proteica y la actuación como agentes quimiotácticos para la fagocitosis.

La determinación del malondialdehído (MDA) es un marcador de estrés oxidativo, ya que es un producto final de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares. Jia et al.⁴⁶ observaron un aumento en la actividad de la enzima SOD probablemente por el aumento de los niveles de MDA por una regulación compensatoria en respuesta al estrés oxidativo de los pacientes con DMAE.

El aumento de MDA en suero se ha correlacionado con un incremento de los niveles de homocisteína y una menor actividad de PON1. Además, la hiperhomocisteinemia se relaciona con niveles superiores de las LDL-ox y de la relación LDL/HDL-ox, debida a la disminución de la actividad de la PON1⁴⁷.

Actualmente se están utilizando como marcadores de la peroxidación lipídica los isoprostanos F_2 , isómeros de las prostaglandinas que se producen como productos finales de la peroxidación del ácido araquidónico mediado por la cadena de transporte de electrones, siendo el más utilizado el 8-epiPGF2a⁴⁸.

3.4.2.4. Oxidación del DNA

El daño oxidativo al ADN se produce por su interacción con ROS o con especies reactivas al nitrógeno. El HO^{\bullet} y el H^{\bullet} son los principales radicales libres que reaccionan con las bases nitrogenadas del ADN, ya que tienen la capacidad de oxidar tanto las bases púricas como las pirimidínicas y el azúcar desoxirribosa. De la misma manera, los radicales N^{\bullet} y peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) también pueden reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN⁴⁹.

Los radicales libres serían capaces de dañar directamente las cadenas de ADN originando su fragmentación. Posteriormente modifican las bases

nitrogenadas que van a ser incorporadas al ADN, dando lugar a compuestos anómalos del tipo de la desoxiguanosina, capaz de provocar mutaciones. Las enzimas reparadores del ADN son capaces de eliminar la mayoría de las lesiones oxidativas, pero no todas. Entre los productos de oxidación del ADN que se han identificado, el 8-hidroxi-2desoxiguanoxina (8-OHdG) es un metabolito relevante, que se utiliza para evaluar el grado de daño oxidativo al ADN³³.

El daño oxidativo en el ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear. Esto se debe a la cercanía de dicho ADN al lugar principal de generación de radicales libres en la célula sana, la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Estas alteraciones causan desde deleciones y mutaciones puntuales hasta ruptura de cadenas y/o trastornos estructurales, incluyendo aberraciones o pérdidas cromosómicas³⁶.

3.5. TRATAMIENTO

3.5.1. Tratamiento de la DMAE seca

No existe un tratamiento efectivo probado para la DMAE seca. Los antioxidantes y la terapia con láser han sido valorados.

Los pacientes con DMAE seca pueden desarrollar DMAE húmeda.

3.5.1.1. Suplementos antioxidantes

Los antioxidantes previenen el daño celular en la retina mediante la limitación de los efectos de los radicales libres producidos en el proceso de absorción de la luz. A continuación vamos a explicar diferentes fórmulas:

3.5.1.1.1. Vitaminas antioxidantes y zinc

El Estudio de Enfermedades Oculares (AREDS) sugiere el tratamiento con vitaminas antioxidantes más zinc para los pacientes con DMAE exudativa o atrófica⁵⁰. La formulación original del estudio AREDS contenía dosis relativamente altas de vitaminas A, C y beta-caroteno más zinc. Sin embargo, el beta-caroteno se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de pulmón, en

particular en los fumadores⁵¹. Una fórmula alternativa, es que la luteína y la zeaxantina sustituyen al beta-caroteno, ha demostrado ser igualmente eficaz en el estudio AREDS2⁵².

Los efectos de las vitaminas C, E, y beta-caroteno, y el mineral zinc antioxidante son variables en pacientes con DMAE, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. En el estudio AREDS⁵⁰ con 3.640 sujetos (55 a 80 años de edad) se observó que los pacientes sin DMAE o DMAE leve no se beneficiaron de la suplementación antioxidante y/o zinc. La fórmula de zinc más antioxidantes, en comparación con el placebo, disminuyó el riesgo de progresión a DMAE avanzada o pérdida de la agudeza visual en el ojo sano en pacientes con DMAE moderada y avanzada. El zinc cuando se administró sólo también se asoció con un menor riesgo de progresión de la DMAE. Estos resultados sugieren que los pacientes con DMAE seca pueden beneficiarse del consumo de antioxidantes y de zinc en las dosis utilizadas en el estudio AREDS^{50,52}.

3.5.1.1.2. Carotenoides: astaxantina, luteína y zeaxantina

Astaxantina

La astaxantina posee una amplia variedad de funciones biológicas, incluyendo propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, anticancerígenas, neuroprotectoras y cardioprotectoras. Además de estas propiedades, astaxantina tiene una elevada actividad antioxidante, 10 veces superior que otros carotenos como la luteína y el beta-caroteno, y 100 veces mayor que el α -tocoferol. El tratamiento reduce la muerte celular inducida por H₂O₂ y la apoptosis en células AEPR-19, el mecanismo por el cual actúa es por citoprotección inducida por el elemento de respuesta antioxidante de Nrf2.

Estos resultados muestran que astaxantina podría ser una adecuada estrategia terapéutica para la DMAE temprana⁵³.

Luteína y zeaxantina

Las concentraciones maculares de luteína y zeaxantina disminuyen con la edad, lo que agrava los efectos nocivos de la luz azul en los fotorreceptores. Son pigmentos maculares que se encuentran en los axones de los fotorreceptores en el EPR y en el segmento externo⁵⁴. Se han propuesto dos mecanismos: los pigmentos maculares pueden actuar como un filtro óptico, debido a su capacidad para

absorber la luz azul, y son potentes antioxidantes neutralizando los radicales libres generados por la luz. Seddon y cols.⁵⁵ observaron que el riesgo de desarrollar la forma más severa de la degeneración macular fue 43% menor en las personas que consumen grandes cantidades de frutas y verduras ricas en luteína y zeaxantina (6mg/día). Delcourt y cols.⁵⁶ observaron que elevadas concentraciones plasmáticas de luteína y zeaxantina se asocian con un menor riesgo de maculopatía relacionada con la edad. En el Estudio CARMA (carotenoides en el maculopatía relacionada con la edad) investigaron que la administración de 12 mg de luteína y 2 mg de zeaxantina en combinación con antioxidantes (120 mg de vitamina C, 15 mg de vitamina E, 20 mg de zinc y 0,4 mg de cobre), tuvieron un efecto beneficioso sobre la función visual y/o era capaz de retrasar la progresión de etapas tempranas y las tardías de la enfermedad⁵⁷. Por último, los niveles bajos de luteína y zeaxantina en la mácula pueden representar un factor de riesgo para el desarrollo patológico DMAE y los investigadores sugieren que la suplementación puede contribuir a mantener la salud ocular.

3.5.1.1.3. Canolol

El canolol es un compuesto fenólico que exhibe una potente actividad antioxidante. En el estudio, los investigadores encontraron que hubo un aumento en la expresión de la catalasa y la glutatión S-transferasa tras el tratamiento con canolol, que se correlacionó positivamente con los efectos protectores de canolol. Además, mediante la unión al elemento de respuesta antioxidante de Nrf2 induce la expresión de genes antioxidantes. La señal de quinasa extracelular regulada (ERK) en cascada ha demostrado proteger contra la lesión celular inducida por el estrés oxidativo y la muerte. Se ha demostrado que el canolol provoca la sobreexpresión de ERK1 / 2 confiriendo resistencia contra la muerte de las células del EPR debido al estrés oxidativo⁵⁸.

3.5.1.1.4. Melatonina

La prevención de acortamiento de los telómeros por los antioxidantes puede ser un método útil para reducir los efectos acumulativos del estrés oxidativo en células del EPR. La melatonina tiene mecanismos antioxidantes y

actúa localmente como una neurohormona y / o neuromodulador. La melatonina ejerce beneficio adicional a través de la regulación de hTERT (subunidad catalítica de la telomerasa) provocando la expresión y estimulado la actividad de la telomerasa en el EPR, que posteriormente ayuda a prevenir o tratar la DMAE. Le sugerimos que la terapia de la melatonina como agentes farmacológicos y / o alimentos ricos en melatonina, especialmente en pacientes con DMAE con los niveles de melatonina séricos bajos o pacientes de alto riesgo sería posiblemente un enfoque alternativo para prevenir y / o tratar la DMAE.

La melatonina tiene potencial para prevenir el acortamiento de los telómeros en el EPR, mientras que no se opone a otros mecanismos, a saber tiene propiedades antioxidantes y / o restauración de la integridad de la barrera, la reducción de VEGF, la hipoxia y niveles de óxido nítrico^{59,60}.

3.5.1.1.5. Complejos vitamínicos con selenio y carotenoides

Las sustancias que poseen actividad antioxidante son las vitaminas C y E, beta-caroteno y algunos minerales, como el zinc, el cobre, el selenio y el manganeso. El EDCCS (Estudio de enfermedades oculares casos-controles) demostró que los niveles plasmáticos elevados de antioxidantes (vitaminas A, C, E, selenio y carotenoides) se asocian con un menor riesgo de desarrollar DMAE neovascular⁶¹. En 1994, el Estudio Longitudinal de Envejecimiento de Baltimore, informó un efecto protector contra DMAE para las concentraciones plasmáticas elevadas de vitamina E⁶². En 2001, el informe de AREDS no. 8, un gran ensayo multicéntrico y aleatorizado reveló que el riesgo de progresión de DMAE avanzada se redujo en un 28% en pacientes con degeneración macular intermedia tratados con altas dosis de suplementos de antioxidantes (vitaminas C y E, zinc y β -caroteno)⁶³. En 2004, el informe de AREDS no. 13 mostraron que la mortalidad fue menor en los pacientes que tomaban zinc solo o con antioxidantes en comparación con los que no tomaban este mineral⁶⁴. Chong y cols.⁶⁵ mostraron que los suplementos antioxidantes impidieron una DMAE precoz. El antioxidante (beta-caroteno, vitamina C y E) y suplementos de zinc fueron capaces de retrasar la progresión de la DMAE avanzada y prevenir la pérdida de la agudeza visual en personas que presenten síntomas de la enfermedad⁶⁶.

3.5.1.1.6. Lípidos: Ácidos grasos omega-3

El papel de los ácidos grasos en DMAE se investigó inicialmente debido a la hipótesis de que la DMAE y la enfermedad cardiovascular pueden compartir una patogenia similar. Los ácidos grasos omega-3, también conocidos como poliinsaturados de cadena larga de ácidos grasos, son esenciales para la salud humana. Los ácidos grasos omega-3 incluyen el ácido alfa-linolénico (un ácido graso de cadena corta), docosahexaenoico (DHA) (su base es el alfa-linolénico) y ácido eicosapentaenoico (EPA) (de cadena larga). Los omega-3 están altamente concentradas en el cerebro y parece ser particularmente importante para la función cognitiva y de comportamiento. De hecho, los niños que no reciben suficiente omega-3 de sus madres durante el embarazo tienen riesgo de desarrollar problemas de visión. Los ácidos grasos omega-3, especialmente el DHA, tienen funciones morfológicas, funcionales y de protección en el retina⁶⁷:

- **Papel morfológico:** el DHA es el principal ácido graso poliinsaturados omega-3 de cadena larga que se encuentra dentro de los segmentos externos y, tiene funciones anti-apoptóticas, anti-inflamatorias y antiangiogénicos.

- **Papel funcional:** el DHA proporciona un ambiente adecuado para los cambios conformacionales en la rodopsina.

- **Papel protector:** el DHA protege contra el envejecimiento de la retina y puede reducir la acumulación de lipofuscina en el EPR y los depósitos de lípidos en la membrana de Bruch. Estas acumulaciones son frecuentes en la patología de DMAE. Además, DHA protege los fotorreceptores de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo.

Varios estudios epidemiológicos⁶⁸⁻⁷⁰ demostraron que el consumo elevado de ácidos grasos omega-3 en la dieta se asoció con una reducción entorno al 38% del riesgo de DMAE tardía. El comer pescado al menos dos veces a la semana se asoció con un menor riesgo de DMAE precoz. AREDS informan que la ingesta total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga se asoció inversamente con la aparición de la DMAE neovascular. AREDS informan n. 23 sugirieron que la ingesta dietética de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga se asocia con un menor riesgo de progresión de drusa bilateral⁷¹. El estudio importante "LUTEGA" que incluye la suplementación o bien una vez

(dosificación D1) o dos veces al día (dosis D2) de 10 mg de luteína / 1 mg de zeaxantina / 100 mg de DHA + 30 mg de EPA/ antioxidantes, o placebo. Ellos observaron que la administración de suplementos de constante parece ser exitoso⁷². Dos importantes estudios observacionales prospectivos revelan que el consumo de pescado y la ingesta de ácidos grasos omega-3 reducen el riesgo de DMAE: El Blue Mountains Eye Study y el Collaborative Cohort Study Melbourne.^{73,74} El objetivo de este estudio longitudinal fue investigar la asociación entre los ácidos grasos de la dieta de referencia y la incidencia de DMAE en los 10 años.

3.5.1.1.7. Resveratrol

Nuevos estudios están evaluando los beneficios de los polifenoles en DMAE, como el resveratrol presente en el vino tinto o las nueces. El resveratrol ejerce protección contra la citotoxicidad inducida por la acroleína en las células AEPR-19 humanos⁷⁵. El comer una porción de nueces por día reduce el riesgo de progresión de la degeneración macular en un 40%⁷⁶. La evidencia epidemiológica sugiere que el consumo moderado de vino y las dietas ricas antioxidantes pueden proteger contra la DMAE.

3.5.1.2. La terapia con láser

Los pacientes con DMAE seca no deben ser tratados con la terapia láser fuera de los ensayos clínicos.

Varios estudios han investigado la eficacia de la terapia con láser para la prevención de la progresión en personas con drusas de alto riesgo. Mientras que los primeros ensayos aleatorios sugieren que la terapia con láser produce una pequeña mejoría en la agudeza visual^{77,78}, los ensayos posteriores mostraron mayores tasas de neovascularización coroidea^{79,80} o ningún beneficio⁸¹.

Una revisión sistemática de nueve ensayos aleatorios encontró que la fotocoagulación con láser no disminuyó el riesgo de revascularización de la coroides, la atrofia geográfica o la pérdida de la agudeza visual⁸².

3.5.2. Tratamiento de la DMAE exudativa

Las terapias eficaces incluyen la inyección intravítrea de un inhibidor del VEGF, la terapia fotodinámica y la suplementación con zinc y vitaminas antioxidantes.

La decisión acerca de las terapias específicas debe tener en cuenta la probabilidad de recuperación visual, que es mejor, con lesiones más recientes y pequeñas, así como los riesgos de las diversas terapias.

En general, **el enfoque** es el siguiente:

- Se sugiere que los pacientes con **DMAE húmeda en uno o ambos ojos** ser tratados con suplementos orales diarias consistente con la formulación AREDS2 (vitamina C 500 mg, vitamina E 400 UI, luteína 10 mg, zeaxantina 1 mg, zinc 80 mg, y cobre 2 mg). Por otra parte, los pacientes que no son fumadores o ex-fumadores pueden usar la formulación del AREDS estándar, que contiene beta-caroteno en lugar de luteína o zeaxantina.

- Para los pacientes que tienen **lesiones subfoveales agudas**, y para los pacientes con lesiones de la **fóvea persistentes** que no han conservado la visión en su segundo ojo, recomendamos ranibizumab intravítreo, bevacizumab o aflibercept.

- Para los pacientes con grandes **lesiones extrafoveales agudas** o lesiones **extrafoveales mal definidas**, también se recomienda el tratamiento con ranibizumab intravítreo, bevacizumab o aflibercept.

- Para los pacientes con **lesiones exudativas crónicas** que han preservado la visión en un segundo ojo y que no parece que vayan a alcanzar la visión de lectura en el ojo afectado, se sugiere la terapia fotodinámica, con o sin ranibizumab intravítreo, bevacizumab o aflibercept.

Papel del VEGF

Tabla 2. Clasificación y función de los tipos de VEGF

Tipos	Función
	<u>Angiogénesis</u>
VEGF-A	<ul style="list-style-type: none"> ○ ↑ <u>Migración</u> de <u>células endoteliales</u> ○ ↑ <u>mitosis</u> de células endoteliales ○ ↑ actividad de la <u>Metano monooxigenasa</u> ○ ↑ actividad de la <u>integrina</u> $\alpha v \beta 3$ ○ creación de la luz de los vasos sanguíneos ○ creación de las fenestraciones de los vasos
	<u>Quimiotáctico</u> para <u>macrófagos</u> y <u>granulocitos</u>
	<u>Vasodilatación</u> (indirectamente, por liberación de <u>NO</u>)
VEGF-B	Angiogénesis embrionaria
VEGF-C	Linfoangiogénesis
VEGF-D	Linfoangiogénesis (bronquiolos)
PlGF	Importante para la vasculogénesis. También necesario durante isquemia, inflamación, cicatrización y cáncer

El VEGF-A es una glucoproteína homodimérica que actúa como factor de crecimiento específico para células endoteliales. Además de su propiedad angiogénica cabría destacar su capacidad para aumentar la permeabilidad vascular así como su efecto proinflamatorio y neuroprotector. Existen múltiples isoformas de VEGF-A: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, siendo VEGF₁₆₅ la más abundante. El VEGF y sus receptores se expresan de forma natural en el ojo sano pudiendo jugar un papel protector al mantener un adecuado flujo sanguíneo hacia el EPR y los fotorreceptores. Sin embargo, ante la reducción del flujo sanguíneo coriocapilar, la acumulación de subproductos del metabolismo lipídico, el estrés oxidativo o las alteraciones de la membrana de Bruch se produce

una sobreexpresión de VEGF₁₆₅ que conduce a un estado patológico. Éste supone un estímulo desencadenante y de retroalimentación de la cascada de neovascularización coroidea provocando la DMAE neovascular.

La inyección intravítrea de fármacos que inhiben el VEGF puede limitar la progresión de la DMAE exudativa y estabilizar o revertir la pérdida visual. Un número de moléculas anti-VEGF se han desarrollado pudiendo limitar los efectos destructores en las membranas neovasculares coroidales en pacientes con DMAE. El retraso en el inicio del tratamiento con VEGF (más de 21 semanas en comparación con menos de 7 semanas) después de los primeros síntomas de la DMAE húmeda se ha asociado con resultados visuales pobres⁸³.

3.5.2.1. Tratamiento intravítreo

3.5.2.1.1. Ranibizumab

Ranibizumab (Lucentis®) es el fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante de anti VEGF-A que inhibe todas las formas biológicamente activas del VEGF. La dosis habitual de ranibizumab intravítrea es de 0,5 mg por inyección intravítrea cada mes. Se deben administrar inyecciones mensuales hasta alcanzar nuevamente una agudeza visual estable durante tres controles mensuales consecutivos. El intervalo entre dos dosis no debe ser inferior a un mes⁸⁴.

Tras la administración intravítrea mensual de ranibizumab a pacientes con DMAE neovascular, las concentraciones séricas de ranibizumab fueron en general bajas, con niveles máximos (C_{max}) por debajo de la concentración de ranibizumab necesaria para inhibir la actividad biológica del VEGF en un 50%. La C_{max} fue proporcional a la dosis. En base al análisis farmacocinético poblacional y a la desaparición sérica de ranibizumab en pacientes con DMAE neovascular tratados con la dosis de 0,5 mg, el promedio de la vida media de eliminación vítrea de ranibizumab es de 9 días aproximadamente. Tras la administración intravítrea mensual de 0,5 mg/ ojo, se prevé que la C_{max} de ranibizumab sérica alcanzada aproximadamente 1 día después de la administración, varíe en general en un rango de entre 0,79 y 2,90 ng/ml, y que la C_{min} varíe en general en un rango de entre 0,07 y 0,49 ng/ml. Se prevé que las concentraciones séricas de

ranibizumab sean aproximadamente 90.000 veces inferiores a las concentraciones vítreas de ranibizumab⁸⁴.

Varios ensayos aleatorios de pacientes con DMAE húmeda han mostrado beneficio⁸⁵⁻⁸⁹:

- El ensayo MARINA asignó al azar 716 pacientes con DMAE húmeda a 24 inyecciones mensuales con ranibizumab 0,3 mg, ranibizumab 0,5 mg o inyección simulada⁸⁹. Después de un año, los pacientes tratados con 0,3 mg o 0,5 mg de ranibizumab perdieron menos agudeza visual basal. También hubo una mejora significativa en la función visual en los pacientes tratados con ranibizumab, en comparación con placebo⁸⁵. Los beneficios se mantuvieron a los dos años y se confirmaron con los resultados de disminución de fugas mediante la angiografía con fluoresceína y la disminución de la fibrosis mediante la tomografía de coherencia óptica⁹⁰.

- El estudio ANCHOR asignó al azar 423 pacientes con DMAE húmeda para intravítrea de ranibizumab (0,3 mg o 0,5 mg) o la terapia fotodinámica con verteporfina⁸⁷. Después de un año, los pacientes tratados con 0,3 o 0,5 mg de ranibizumab perdieron menos agudeza. Los resultados fueron similares a los dos años de seguimiento⁸⁸.

3.5.2.1.2. Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin[®]) es un anticuerpo monoclonal completo con dos sitios de unión para el VEGF y capaz de inhibir todas sus formas activas (igual que Ranibizumab)⁹¹. Bevacizumab está aprobado como una infusión intravenosa para el tratamiento sistémico del cáncer colorrectal. Sin embargo, el tratamiento con bevacizumab intravítreo para DMAE es mucho menos costoso que el tratamiento con ranibizumab intravítreo⁹². Tras la tramitación y autorización del uso compasivo, se inició el tratamiento con bevacizumab intravítreo 1,25 mg con periodicidad mensual.

Al tratarse de una terapia fuera de las condiciones autorizadas (off-label), no hay los datos farmacocinéticos sobre bevacizumab intravítreo.

Los resultados de los ensayos aleatorios que comparan bevacizumab y ranibizumab no encontraron diferencias en la agudeza visual para el tratamiento de la DMAE húmeda^{93,94}. Hubo efectos adversos más graves con bevacizumab que

ranibizumab (39,3 frente a 31,7% respectivamente), aunque los eventos de mortalidad y aterotrombóticos fueron los mismos.

3.5.2.1.3. Pegaptanib

Pegaptanib (Macugen®) fue el primer inhibidor de VEGF aprobado por EE.UU. La administración de Pegaptanib es 0,3 mg una vez cada seis semanas. Actualmente, Pegaptanib es menos eficaz que ranibizumab o bevacizumab y de uso poco frecuente ya que otros anti-VEGF intravítrea proporciona mayor beneficio con menor toxicidad.

En animales, pegaptanib se absorbe lentamente hacia la circulación sistémica desde el ojo después de una administración intravítrea. En los humanos, la media \pm la desviación estándar de la semivida plasmática aparente de pegaptanib después de una dosis mono-ocular de 3 mg (10 veces la dosis recomendada) es de 10 ± 4 días. Tras un periodo de 1 a 4 días después de una dosis mono-ocular de 3 mg en seres humanos, la concentración plasmática máxima media es de unos 80 ng/ml. Pegaptanib no se acumula en el plasma cuando se administra de forma intravítrea cada 6 semanas. A dosis inferiores a 0,5 mg/ojo, las concentraciones plasmáticas de pegaptanib probablemente no superan 10 ng/ml. No se ha valorado la biodisponibilidad absoluta de pegaptanib después de la administración intravítrea en seres humanos, siendo de aproximadamente 70-100% en animales. En los animales que recibieron dosis de pegaptanib de hasta 0,5 mg/ojo en ambos ojos, las concentraciones plasmáticas fueron 0,03% a 0,15% de las alcanzadas en el humor vítreo. En ratones, ratas, conejos, perros y monos, pegaptanib se distribuye principalmente en el plasma y no llega a los tejidos periféricos en cantidades apreciables. Pegaptanib se metaboliza por endo- y exonucleasas. En conejos, pegaptanib es eliminado tanto en su forma inalterada como sus metabolitos, principalmente en la orina⁹⁵.

3.5.2.1.4. Aflibercept

Es una proteína de fusión recombinante que compite por la unión de VEGF y por lo tanto, tiene un efecto similar a los inhibidores de VEGF. Es el fármaco más reciente aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con DMAE húmeda pero en España su indicación principal es el cáncer colorrectal

metastásico resistente o que ha progresado después de un régimen con oxaliplatino.

La pauta posológica para aflibercept es administrar tres dosis (2 mg) a intervalos de cuatro semanas, seguido de 2 mg cada ocho semanas. Tras su administración intravítrea, aflibercept se absorbe lentamente desde el ojo a la circulación sistémica en la que generalmente se observa formando un complejo estable e inactivo con el VEGF; sin embargo, solamente “aflibercept libre” es capaz de unirse al VEGF endógeno. En un sub-estudio farmacocinético realizado en 6 pacientes con DMAE exudativa con toma de muestras frecuente, las C_{max} sistémica de aflibercept libre fueron bajas, con una media de aproximadamente 0,02 microgramos/ml (intervalo de 0 a 0,054) en el plazo de 1 a 3 días tras la inyección intravítrea de 2 mg, y fueron indetectables dos semanas después de la administración en casi todos los pacientes. Aflibercept no se acumula en el plasma cuando se administra por vía intravítrea cada 4 semanas⁹⁶.

La C_{máx} plasmática media de aflibercept libre es aproximadamente de 50 a 500 veces menor que la concentración de aflibercept necesaria para inhibir la actividad biológica del VEGF sistémico en un 50% en los modelos animales. Por lo tanto, son improbables los efectos farmacodinámicos sistémicos, como por ejemplo cambios en la presión arterial pero se debe monitorizar al paciente. Como ocurre con otras proteínas de gran tamaño, es de esperar que tanto el aflibercept libre como el fijado se eliminen mediante catabolismo proteolítico⁹⁶.

En dos ensayos aleatorios de 2.419 pacientes adultos con DMAE húmeda, aflibercept intravítrea (0,5 mg mensuales, 2,0 mg mensual, o 2,0 mg cada dos meses) fue igualmente eficaz en la mejora de la agudeza visual en uno o dos años en comparación con ranibizumab intravítrea mensuales^{97,98}. En un estudio prospectivo de 49 pacientes con DMAE resistentes al ranibizumab, aflibercept más de 24 semanas mejoró la agudeza visual aunque si la mejoría se mantiene durante un período más largo es desconocida⁹⁹. Aflibercept es menos costoso que ranibizumab y puede permitir una dosificación menos frecuente (cada dos meses). Sin embargo, Aflibercept no se ha comparado directamente con bevacizumab, que es menos costoso.

Efectos adversos de los inhibidores de VEGF

A corto plazo los efectos adversos (oculares y no oculares) parecen

similares. Los datos sobre los efectos adversos a largo plazo de los inhibidores de VEGF se desconocen.

- **Oculares:** endoftalmitis (1,0 a 1,3%) y uveítis grave (1,3%)^{87,90,100}. El aumento de la presión intraocular en los ensayos aleatorios fue temporal y la normalización de dicha presión se produce una hora después de la inyección¹⁰¹. Sin embargo, dos estudios de cohorte retrospectivos mostraron una asociación entre las inyecciones intravítreas anti-VEGF y un mayor riesgo de presión intraocular sostenida¹⁰². Otros efectos adversos oculares fueron: dolor, queratitis, cataratas, opacidades vítreas, inflamación de la cámara anterior, alteraciones de la visión, edema corneal, y secreción ocular¹⁰³.

- **Otros:** los efectos cardiovasculares no están claros^{104,105}. Hay pocos estudios que analizan los efectos adversos de los fármacos anti-VEGF. En un ensayo aleatorizado con 1.208 pacientes, en el que se compararon los efectos adversos de bevacizumab y ranibizumab, la tasa de efectos adversos graves fue significativamente mayor en pacientes tratados con bevacizumab que con ranibizumab (24% *versus* 19% respectivamente), principalmente infecciones (neumonía y las infecciones del tracto urinario) y los trastornos gastrointestinales (sangrados, náuseas y vómitos)¹⁰⁶. Destacar que se necesitan más estudios para determinar si hay un aumento del riesgo de accidente cerebrovascular o cardiovascular, pero los médicos deben ser conscientes de esta posible relación cuando se utilizan inhibidores de VEGF en pacientes con mayor riesgo de accidente cerebrovascular¹⁰⁷.

3.5.2.2. *La fotocoagulación con láser térmico*

La fotocoagulación con láser térmico utiliza una intensidad relativamente alta para coagular la membrana coroidea anormal. Un efecto adverso de este tratamiento es un daño focal en la retina con la formación de un punto ciego permanente. Si se utiliza este tratamiento debería limitarse a lesiones muy pequeñas fuera de la mácula central. Rara vez se recomienda.¹⁰⁸

3.5.2.3. *La terapia fotodinámica*

Implica la inyección intravenosa del colorante fotosensibilizante (verteporfina) justo antes del tratamiento con un láser de foto-activación aplicado

a través del ojo con una lente de contacto específica. Los radicales libres que dañan el endotelio vascular retienen el colorante activado más que los vasos normales. Sin embargo, esta terapia a menudo hay que repetirla¹⁰⁹. Por ejemplo, el 33% de un total de 108 ojos estudiados mostraron neovascularización coroidea recurrente a los 18 meses de la terapia fotodinámica¹¹⁰.

La utilización de la terapia fotodinámica ha disminuido con el aumento del uso de la terapia anti-VEGF.

3.5.2.4. Inhibidores de VEGF con la terapia adyuvante

Las dos técnicas que causan oclusión vascular al tejido diana han sido investigadas como tratamiento adyuvante para ser utilizado en combinación con fármacos anti-VEGF. Estas técnicas son:

- *La termoterapia transpupilar (TTT)*: aplicación de determinadas ondas a través de la pupila al tejido diana.

- *La terapia fotodinámica* se ha descrito anteriormente.

Ensayos aleatorios en el cual administran TTT sola o TTT con Ranibizumab demostraron ser más efectivas la terapia combinada con otros anti-VEGF¹¹¹. La terapia fotodinámica obtuvo los mismos resultados, es decir, más efectiva la combinada con ranibizumab¹¹² pero con bevacizumab ha sido eficaz en una serie de casos y se está investigando en ensayos aleatorios¹¹³⁻¹¹⁵.

3.5.2.5. Cirugía

- *Cirugía Submacular*: consiste en la eliminación de la neovascularización subretiniana anormal y de hemorragias submaculares. Los ensayos clínicos han sido muy decepcionantes¹¹⁶⁻¹¹⁸.

- *Cirugía de translocación macular*: es experimental y consiste en mover la mácula a una zona menos afectada de la retina en pacientes con neovascularización coroidea subfoveal¹¹⁹.

La terapia farmacológica eficaz ha limitado el uso de la modalidad quirúrgica en pacientes con grandes hemorragias submaculares.

3.5.2.6. Radioterapia

Un meta-análisis de ensayos aleatorizados y controlados concluyó que no se producían suficientes evidencias de beneficios¹²⁰. La seguridad a largo plazo de la terapia de radiación es desconocida.

3.5.2.7. Suplementos antioxidantes

Ver el apartado de tratamiento de la DMAE seca (3.5.1.1).

3.6. HIPERHOMOSCISTEINEMIA

3.6.1. Concepto y metabolismo de la homocisteína

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido no constituyente de la dieta y es exclusivamente un producto intermediario del metabolismo de la metionina. La Hcy es producida por el organismo humano a partir de la desmetilación de la metionina y su regulación ocurre por las vías metabólicas de remetilación y transulfuración. Es un aminoácido con un grupo sulfhidrilo susceptible con diversos metabolitos con grupos tiol y con otras moléculas de Hcy. La unión de dos moléculas de Hcy mediante un enlace disulfuro da lugar a homocistina.

Pueden sintetizarse disulfuros mixtos de Hcy con cisteína libre o con residuos de cisteína de péptidos y proteínas, esta variante se denomina Hcy ligada a proteínas. Otro derivado es la tiolactona de Hcy, que se obtiene al perder la Hcy una molécula de agua.

La Hcy se puede encontrar en plasma en las siguientes formas y distribuciones:

- 1% en su forma reducida.
- 70% unida a albúmina.
- 29% formando compuestos disulfuro de peso molecular bajo.

La suma de todas estas especies de Hcy es denominada Hcy total.

La Hcy no ligada a las proteínas se filtra en los glomérulos renales y se reabsorbe en su mayor parte en los túbulos renales. En condiciones normales se encuentran muy pequeñas cantidades en la orina, pero los pequeños descensos en el aclaramiento pueden alterar los niveles de Hcy total plasmática.

Cuando los niveles de metionina son normales, el 50% de la Hcy entra en la ruta metabólica de la transulfuración, que es regulada por la cistationina B-sintetasa (CBS), y utiliza como catalizador a una enzima dependiente del piridoxal-5-fosfato (un metabolito activo de la vitamina B₆). En dicha ruta, la Hcy se condensa con serina para formar cistationina y α -cetobutirato, por la acción de la enzima gamma-cistationasa. La cistationina es hidrolizada a cisteína por una cistationasa que requiere también vitamina B₆. Cuando los niveles de metionina están elevados, la Hcy es utilizada para la síntesis de la cisteína de manera irreversible. Eventualmente, la cisteína puede convertirse a glutatión, taurina y otros metabolitos sulfurados.

Si los niveles de metionina son bajos, la Hcy es utilizada para mantener los niveles de metionina a través de varias vías de remetilación. En los tejidos extrahepáticos, la Hcy es remetilada por acción catalítica de la enzima metionina sintetasa (MS), que es dependiente de la vitamina B₁₂ y utiliza al metiltetrahidrofolato como donador de grupos metilo; también la betaína-homocisteína metiltransferasa, que utiliza la betaína como donante de grupos metilo, puede catalizar esta reacción en el hígado, riñón y glándulas suprarrenales.

A su vez, la síntesis de metiltetrahidrofolato es catalizada por la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) dependiente de la vitamina B₂. De tal forma que la deficiencia de estas vitaminas ocasionaría una elevación de Hcy en el plasma (Figura 2).

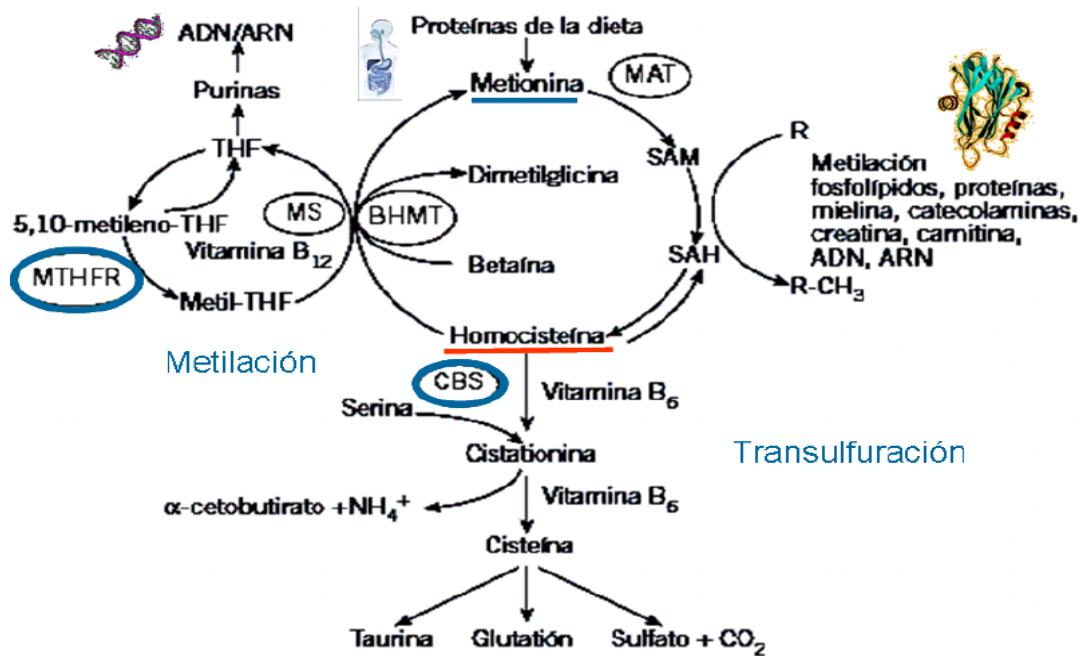


Figura 2. Vía de la metionina y metabolismo de la Hcy, con representación de rutas completas, transferencia y eliminación. SAM, S-adenosilmetionina; MS, metionina sintetasa; SAH, S-adenosilhomocisteína; THF, tetrahidrofolato; MTHFR, metilentetrahidrofolato reductasa; CBS, cistatiónina-B-sintetasa; BHMT, betaína-homocisteína metiltransferasa; MAT, metionina adenosiltransferasa)

Vitaminas implicadas en el metabolismo de Hcy

La **vitamina B₆** interviene en la interconversión de la serina-glicina y como cofactor de la cistatiónina beta sintasa, la enzima que irreversiblemente convierte la Hcy a cistatiónina.

Serina + tetrahidrofolato \leftarrow (fosfato piridoxal) \rightarrow Glicina + 5-metiltetrahidrofolato.

La **vitamina B₁₂** es cofactor de la metionina sintetasa, la cual participa en la metilación de la Hcy para formar metionina. El folato en la forma de 5-metiltetrahidrofolato dona el grupo metil en esta reacción.

El flavín adenín dinucleotido (FAD), la forma coenzimática de la **riboflavina (B₂)**, actúa como un grupo prostético de la MTHFR que interviene en resintetizar el 5-metiltetrahidrofolato.

3.6.2. Mecanismos fisiopatológicos

Varios sistemas experimentales han producido numerosos mecanismos posibles para dar cuenta de los efectos vasculares de la Hcy¹²¹⁻¹²⁵.

- La Hcy tiene actividad *mitogénica* en las células musculares lisas vasculares pudiendo causar un engrosamiento de la pared arterial.

- Se puede inducir la liberación intracelular de calcio en estas células, aumentando de este modo su proliferación y la masa de la matriz extracelular, promoviendo así la isquemia con la consiguiente *neovascularización*

- La Hcy causa daño oxidativo a las células endoteliales y aumenta la *peroxidación de las LDL* promoviendo el proceso de formación de placa de ateroma.

- El aumento de la Hcy podría aumentar los eventos trombóticos, ya que *inhibe* la expresión de la *trombomodulina* secretada por las células endoteliales para evitar la activación de la proteína C. Además, la Hcy aumenta la actividad de los *factores V, VII y la adhesión de las plaquetas* al endotelio.

- El aumento de la resistencia de los vasos coroideos y la *disminución de la perfusión coroidea* causan una atrofia del EPR y estimulan la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular para la neovascularización.

- Otro de los cambios celulares que induce la hiperhomocisteinemia (hHcy) ocurre en el RE, con la modificación de algunas proteínas originada por la participación de la Hcy en reacciones bisulfuro. Tal modificación conduce al *desdoblamiento de proteínas* secretoras y de membrana, tales como la trombomodulina y el factor de Von Willebrand.

- Sus consecuencias celulares alteran el metabolismo de los lípidos y producen la activación de vías inflamatorias y vía de señalización de la insulina. Además, el estrés del RE severo o prolongado conduce a la *apoptosis celular*.

- Los altos niveles de Hcy en la lesión endotelial vascular son debidos a la liberación de radicales libres, la inhibición de la enzima GPx, la interferencia con los factores de coagulación y la peroxidación lipídica, factores que modifican la pared del vaso (Figura 3).

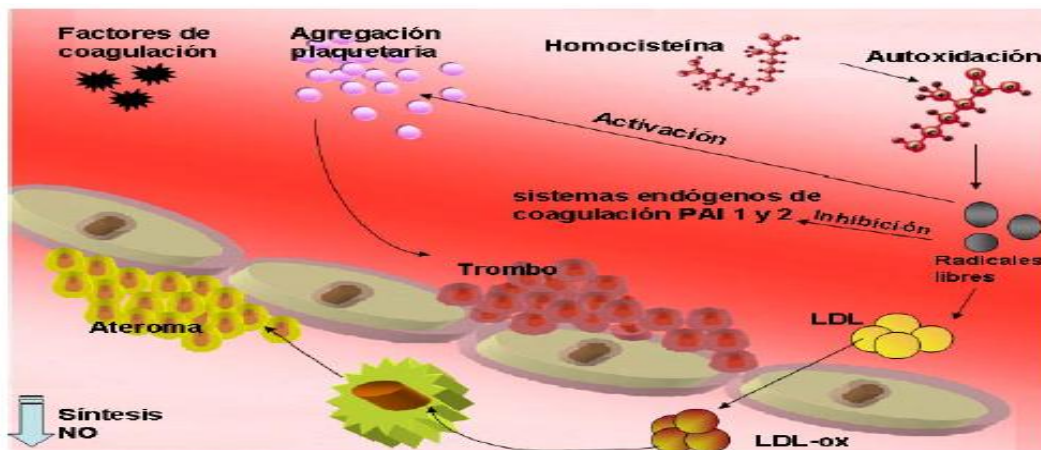


Figura 3: Patogénesis de la hiperhomocisteinemia. La figura esquematiza una parte de los mecanismos por los cuales se piensa que la homocisteína libre en altas concentraciones causa daño endotelial. (Diseñada por Sharma y cols. 2006).

3.6.3. Hiperhomocisteinemia y homocistinuria

La hiperhomocisteinemia (hHcy) se refiere a la leve o moderada elevación de Hcy en plasma, mientras que homocistinuria se refiere a severa elevación del nivel de Hcy en plasma provocando que el aminoácido esté presente en grandes cantidades en la orina.

El Centro del Control de Enfermedades y Prevención de Salud Nacional y Nutrición de los Estados Unidos publicó los rangos de referencia para Hcy total plasmática que oscilan entre 5 y 12 $\mu\text{mol/L}$ dependiendo del sexo y edad.

La hHcy se sitúa entre valores plasmáticos de Hcy total en adultos superiores a 15 $\mu\text{mol/l}$. Se puede clasificar en los siguientes rangos:

- Moderada (15 a 30 $\mu\text{mol/L}$).
- Alta (30 a 100 $\mu\text{mol/L}$).

- Severa (más de 100 $\mu\text{mol/L}$).

Sin embargo, estos rangos aun están en discusión ya que existen marcadas diferencias en los rangos referenciales encontrados en la literatura. Es probable que las diferencias obedezcan a la diversidad de metodologías utilizadas (cromatográficas o inmunoenzimáticas), diferencias en el manejo de la muestra (por ejemplo tiempo de almacenamiento después de la extracción) y principalmente, a la diversidad de factores nutricionales y étnicos de las poblaciones estudiadas.

Se ha probado que por cada 5 $\mu\text{mol/L}$ de aumento en los niveles de Hcy se eleva un 20% el riesgo de enfermedad cardiovascular. Se ha estimado que hasta un 10% de las enfermedades coronarias pueden deberse a hHcy. Finalmente, el Proyecto de Acción Concertada Europea mostró que la hHcy es un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular, similar al tabaquismo o la hiperlipidemia^{126,127}.

3.6.3.1. Factores desencadenantes de la hiperhomocisteinemia

La hHcy puede ser causada por:

- Los determinantes del **estilo de vida**.
- **Condiciones clínicas:** diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, hipotiroidismo, psoriasis, enfermedades como la leucemia linfoblástica.
- La asociación entre el **trasplante de órganos** y los niveles elevados de Hcy en plasma probablemente está relacionado con la utilización de **agentes inmunosupresores** y alteraciones en la función renal.
- El consumo de **tabaco, alcohol y cafeína** produce un aumento de los niveles de Hcy en plasma por la disminución de las reservas de ácido fólico y vitamina B₆.
- **Fármacos:** el metotrexato y medicamentos anticonvulsivantes como la carbamazepina y la fenitoína alteran el metabolismo del folato. El óxido nitroso interfiere con la enzima metionina sintasa. La ciclosporina A reduce la función renal. Estos procesos aumentan los niveles plasmáticos de Hcy.
- **Factores genéticos** determinantes: el metabolismo de la Hcy anormal puede ser ocasionado por defectos hereditarios en las enzimas como

CBS, MTHFR y MS. El folato dietético es convertido por la MTHFR en 5-metiltetrahidrofolato, que se requiere para la remetilación de la Hcy a metionina.

La homocigosis para la variante termolábil de la enzima MTHFR (genotipo TT) es una causa relativamente frecuente de los niveles elevados de Hcy plasmática en la población general, que se producen a menudo en asociación con los niveles bajos de folato en suero.

- **Deficiencia de vitaminas:** El aumento de los niveles de Hcy en sangre puede reflejar la deficiencia de ácido fólico, vitamina B₆ y / o vitamina B₁₂.

3.6.3.2. Factores desencadenantes de la homocistinuria

La homocistinuria puede ser causada por:

- Defectos genéticos en el metabolismo de la Hcy.

La deficiencia homocigótica del gen de la CBS produce homocistinuria que puede dar lugar a unos niveles de Hcy en plasma mayores de 100 $\mu\text{mol} / \text{l}$.

Mutaciones puntuales en el gen de la MTHFR pueden originar una reducción en su actividad. La mutación 677C-T, conduce a una sustitución de alanina por valina que produce la forma termolábil menos activa (o genotipo TT) de la enzima MTHFR^{128,129}.

La relación entre la MTHFR termolábil y elevada Hcy plasmática no está clara pudiendo estar relacionada con los niveles de folato en el suero. La deficiencia de folato puede conducir a la expresión del genotipo TT, o pacientes con este genotipo puede necesitar mayores niveles de folato sérico para mantener la función normal de la enzima.

Las mutaciones de un gen que codifica la síntesis de metilcobalamina desencadenan una hipofunción de la enzima que conduce a un aumento de Hcy en plasma e hipometioninemia¹³⁰.

El nivel de Hcy en pacientes con homocistinuria hereditaria debido al polimorfismo MTHFR es significativamente elevado, y estos pacientes tienen una mayor incidencia de trombosis y de enfermedades cardiovasculares^{131,132}, dislocación del cristalino, glaucoma y cataratas¹³³⁻¹³⁶.

3.6.4. Hiperhomocisteinemia y DMAE

Seddon y cols.¹³⁷ midieron los niveles de Hcy en 934 pacientes, de ellos 547 presentaban DMAE. Los valores medios de Hcy fueron superiores en pacientes con DMAE avanzada cuando se compararon con los valores medios observados en pacientes sin DMAE. Observaron que los valores superiores a 12 $\mu\text{mol} / \text{l}$ se asociaron con un aumento del riesgo de DMAE.

Ruth Axer-Siegel y cols.¹³⁸ analizaron la asociación entre la hHcy y la DMAE. En un total de 58 pacientes (24 hombres y 34 mujeres) con una edad media de 76.3 años, observaron una asociación significativa entre niveles plasmáticos elevados de Hcy y la DMAE exudativa, sin embargo no se observa una asociación con la DMAE atrófica.

La Hcy se puede convertir en tiolactona-homocisteína en todas las células, lo que conduce a un daño nocivo a proteínas por homocisteinilación que puede estar involucrada en la patología de las enfermedades vasculares¹³⁹. PON1 muestra actividad tiolactonasa contribuyendo a la desintoxicación de este metabolito de la Hcy. En ratones, se ha encontrado que el ARNm de PON1 es regulado negativamente (con una actividad PON1 inferior) en presencia de una moderada o severa hHcy, que es causada por una dieta hiperhomocisteinémica o por una deficiencia genética de la enzima CBS¹⁴⁰.

Orhan y cols.³⁹ observaron que pacientes con DMAE exudativa tenían unas concentraciones de Hcy significativamente mayores. Los niveles altos de Hcy se correlacionaron con mayores niveles de MDA en suero y una menor actividad de PON1. Según sus resultados, se puede afirmar que la Hcy regula negativamente la expresión del gen activo PON1 en la DMAE, lo que contribuye a reducir la actividad de la PON1 aumentando el estrés oxidativo. Otros autores como Baskol y cols.¹⁴¹ y Javadzadeh y cols.⁴⁷, observaron una actividad PON1 más baja en pacientes con DMAE y una correlación negativa con los niveles de MDA. Además, relacionaron el incremento de las LDL-ox y el cociente LDL-ox/HDL con altos niveles de Hcy debido a la baja actividad de la PON1.

Javadzadeh y cols.¹⁴², en un estudio realizado con 45 pacientes con DMAE neovascular observaron mayores niveles de Hcy y LDL-ox cuando se compararon

con un grupo control. Además, estos pacientes presentaban niveles bajos de antioxidantes como GSH.

Se puede concluir que niveles bajos de antioxidantes y elevados de agentes oxidantes como la Hcy proporcionan un ambiente oxidativo asociado a la oxidación de las LDL. Además el aumento de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo observado en pacientes con DMAE pueden estar asociados con una disminución de PON1.

3.6.5. Hiperhomocisteinemia asociada al déficit de vitaminas

Los factores dietéticos desempeñan un papel importante en el control de los niveles de Hcy. La contribución genética a la variación en la hHcy se estimó en aproximadamente un 9%, en comparación con aproximadamente el 35% que podría atribuirse a los niveles bajos de folato y vitamina B₁₂¹⁴³⁻¹⁴⁵.

El tratamiento con ácido fólico, vitamina B₆ y vitamina B₁₂ ha demostrado reducir los niveles de Hcy en los estudios de intervención, disminuyendo el riesgo de DMAE^{145,146}. Diversos autores^{147,148} indican que hay una asociación directa entre la concentración de Hcy plasmática y el riesgo de DMAE, lo que sugiere que la Hcy puede ser un factor de riesgo modificable para la DMAE.

Rochtchina y cols.¹⁴⁷ observaron que niveles de Hcy superiores a 15 $\mu\text{mol/l}$ se asocian con una mayor probabilidad de DMAE en individuos de edades inferiores a 75 años. Los participantes con niveles de Hcy menores o iguales a 15 $\mu\text{moles/l}$ y niveles séricos bajos de vitamina B₁₂, tenían cuatro veces mayor probabilidad de sufrir DMAE. Esta asociación no se observó en paciente con niveles disminuidos de folato.

Kamburoglu y cols.¹⁴⁹ observaron en 60 pacientes con DMAE (30 pacientes con DMAE atrófica y 30 pacientes con DMAE exudativa) que presentaban niveles elevados de Hcy plasmática (mayores en los pacientes con DMAE exudativa). Los niveles de vitamina B₁₂ fueron significativamente inferiores en los pacientes con DMAE exudativa cuando se comparan con los niveles observados en pacientes con DMAE atrófica y en un grupo control.

William y cols.¹⁵⁰ evaluaron el riesgo de DMAE en mujeres con riesgo elevado de enfermedad vascular, que consumían diariamente un suplemento de

ácido fólico, piridoxina y cianocobalamina durante un promedio de 7,3 años de seguimiento. Se realizaron dos grupos uno tratado con placebo (control) y otro con ácido fólico (2.5mg/d), vitamina B₆ (50 mg/d) y vitamina B₁₂ (1mg/d). Un efecto beneficioso del tratamiento combinado sobre el total de pacientes con DMAE se inició aproximadamente tras dos años de tratamiento y persistió durante todo el ensayo. En el grupo suplementado se observó una disminución del riesgo de DMAE en el 35-40% de los pacientes

Gopinath y cols.¹⁵¹ analizaron los niveles plasmáticos de ácido fólico, vitamina B₁₂ y Hcy en individuos de edad ≥ 55 años y observaron que el déficit de vitamina B₁₂ y de folato se asoció con un mayor riesgo de incidencia de DMAE. Además indican que la suplementación con vitamina B₁₂ puede reducir un 47% el riesgo y sugieren como medida preventiva la suplementación de vitaminas del grupo B y folatos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTRA POBLACIONAL

La muestra poblacional está constituida por 163 individuos con DMAE exudativa de ambos sexos (80 hombres y 83 mujeres) con una edad comprendida entre los 55 y los 82 años (el valor medio de la edad es 71 ± 7.29 años). El grupo control está formado por 170 voluntarios sanos de ambos sexos (88 hombres y 82 mujeres) con una edad comprendida entre los 55 y los 78 años (el valor medio de edad es 71 ± 6.68 años).

Se seleccionaron los pacientes con DMAE exudativa en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Morales Meseguer de Murcia y tenían por lo menos dos años de monitorización de la enfermedad por parte del servicio de oftalmología.

A los pacientes con DMAE exudativa se les realizó un examen ocular que consistió en las siguientes pruebas. (Tabla 3)

Tabla 3. Pruebas diagnósticas realizadas a los pacientes con DMAE exudativa.

Test agudeza visual ETDRS
Biomicroscopia del segmento anterior
Presión intraocular
Retinografía
Angiografía
OCT

OCT: Optical Coherence Tomography

Los participantes en el estudio fueron informados de manera individual y todos firmaron el documento de consentimiento y conformidad (Anexo 1). El

estudio cumple con las normas deontológicas reconocidas por la declaración de Helsinki (revisión de Hong-Kong, Septiembre de 1989), las recomendaciones de la buena práctica clínica de la CEE (documento 111/3976/88 de julio de 1990) y la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos (R.D. 561/1993, sobre Ensayos Clínicos) (Anexo 2).

Tabla 4. Descripción de la muestra poblacional.

	Grupo control		Pacientes con DMAE exudativa		Total	
	Uds.	%	Uds.	%	Uds.	%
N	170		163		333	
Hombres	88	49.08	88	51.76	68	50.45
Mujeres	82	50.92	82	48.24	65	49.55

N=número; Uds=unidades

Los criterios de exclusión fueron:

- a) Diabetes mellitus.
- b) Hipertensión.
- c) Enfermedad cardiovascular.
- d) Hábitos tóxicos: fumador, consumo de alcohol y/o drogas.
- e) Consumir suplementos multivitamínicos o antioxidantes
- f) Padecer una enfermedad renal, hepática o sistémica grave
- g) Presentar hábitos dietéticos que no siguen patrones estándar(p.e: dietas alimentarias sin frutas ni verduras, sin legumbres ni hortalizas, dietas vegetarianas, veganas, macrobióticas, proteinadas, etc.)

Se seleccionó un subgrupo de 73 pacientes de la muestra de pacientes con DMAE exudativa que iban a ser tratados con terapia anti-VEGF. Fueron 40 mujeres y 33 hombres con un valor medio de edad de 71 años (55-82 años). A

estos pacientes se les realizará un análisis del riesgo cardiovascular y de estrés oxidativo antes y después de la terapia anti-VEGF.

Por último, para el análisis del estrés oxidativo y la homocisteína *in vitreo* y plasmática se seleccionaron dos grupos controles:

- Grupo control del estrés oxidativo y homocisteína plasmática: 80 pacientes del grupo control anterior, es decir población sana. Fueron 40 hombres y 40 mujeres con una edad comprendida entre los 66 y los 80 años (el valor medio de la edad es 75 ± 2 años). Se seleccionaron aleatoriamente.

- Grupo control de la homocisteína *in vitreo*: 40 pacientes con membrana epirretiniana idiopática (20 hombres y 20 mujeres) con una edad comprendida entre los 57 y los 80 años (el valor medio de la edad es 76 ± 4 años) (Figura 4).



Figura 4. Esquema de la muestra poblacional de los estudios planteados. El color AZUL indica los pacientes con DMAE y el color LILA los grupos controles (lila fuerte: individuos sanos y lila claro: pacientes con membrana epirretiniana idiopática). El color rojo indica el estudio de riesgo cardiovascular entre los pacientes con DMAE e individuos sanos. El color naranja nos indica el estudio de riesgo cardiovascular, stress oxidativo y homocisteína plasmática e invitreo realizado a los pacientes con DMAE exudativa que

recibieron terapia anti-VEGF y grupos controles.

4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se han realizado los siguientes análisis:

1.- Análisis de determinados factores de riesgo cardiovascular en pacientes con DMAE exudativa, comparado con un grupo control.

2.- Análisis de determinados marcadores de estrés oxidativo en pacientes con DMAE exudativa, comparado con un grupo control.

3.- Estudio del efecto de la terapia anti-VEGF con Ranibizumab y Pegaptanib, sobre determinados factores de riesgo cardiovascular y de estrés oxidativo en pacientes con DMAE exudativa.

4. Análisis de la homocisteína plasmática y en vítreo en pacientes con DMAE exudativa, comparados con una grupo control.

4.2.1. Análisis de determinados factores de riesgo cardiovascular en pacientes con DMAE exudativa comparado con un grupo control

Se seleccionaron 163 pacientes diagnosticados de DMAE exudativa del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Morales Meseguer (Murcia). El periodo de selección estuvo comprendido entre enero 2011 a mayo 2013. A los pacientes seleccionados se les realizó la extracción de sangre en el Laboratorio del Hospital Morales Meseguer.

El grupo control de 170 individuos sanos se ha seleccionado de voluntarios del Centro de Salud Murcia (San Andrés), durante el mismo periodo de tiempo anterior. La extracción de sangre se realizó en el centro de salud.

Ambas extracciones sanguíneas se realizaron de la vena antecubital. La sangre fue centrifugada a 3500 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener suero o plasma y los viales fueron almacenados a -80°C hasta su

posterior análisis. Las muestras fueron procesadas según los biomarcadores analizados en los siguientes hospitales:

1. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca: homocisteína plasmática.
2. Hospital General Universitario Morales Meseguer: colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL, apolipoproteína A, fibrinógeno, proteína C reactiva.
3. Laboratorios UCAM: biomarcadores de stress oxidativo (actividad total antioxidante, glutatión oxidado, glutatión reducido, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa)
4. Clinica Quirón: homocisteína invitreo.

Los análisis se han realizado en plasma, suero y eritrocitos según el parámetro analizado.

Para obtener el lisado de eritrocitos, inicialmente se centrifugó un volumen de 500 mL de sangre heparinizada a 3000 rpm durante 10 min para separar el plasma. El sobrenadante se retiró y los eritrocitos se lavaron tres veces con 4.5 mL de solución salina fría (9,0 g/L de NaCl). Ya lavados los eritrocitos se tomaron 100 mL y se agregó 4 volúmenes de agua desionizada fría para producir hemólisis, colocándolo posteriormente en un vial de 2.0 mL. Después de hemolizar, se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min para separar las membranas y organelos, posteriormente se separó el sobrenadante y el precipitado se desechó. Al sobrenadante se le adicionaron 0.25 mL de cloroformo y 0.5mL de etanol, centrifugando a 3000 rpm durante 10 min, para desnaturalizar la hemoglobina.

Para finalizar se obtiene el sobrenadante (lisados) en alícuotas de 500 μ L, para su posterior análisis.

La Tabla 5 muestra los marcadores analizados a los pacientes con DMAE exudativa y a los individuos del grupo control, cuya metodología será descrita en cada capítulo correspondiente.

Tabla 5. Marcadores analizados en el grupo de pacientes con DMAE exudativa y en el grupo control.

Marcadores de riesgo cardiovascular	Biomarcadores de inflamación
Colesterol total	PCR
HDL	Fibrinógeno
LDL	
Triglicéridos	
Hcy	

Hcy: homocisteína; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; PCR: proteína C reactiva.

4.2.2. Estudio de la influencia de la terapia anti-VEGF (Ranibizumab y Pegaptanib) sobre determinados marcadores de riesgo cardiovascular y de estrés oxidativo en pacientes con DMAE exudativa

Se seleccionaron 73 pacientes con DMAE exudativa que nunca habían recibido tratamiento previo con anti-VEGF, para analizar el efecto de los fármacos antiangiogénicos sobre el posible riesgo cardiovascular y el estrés oxidativo.

Los pacientes con DMAE exudativa se dividieron aleatoriamente en dos grupos:

-37 pacientes recibieron 0,3 mg de Pegaptanib (Macugen®).

-36 pacientes recibieron 0,5 mg de Ranibizumab (Lucentis®).

El ranibizumab se administró cada 4 semanas y cada 6 semanas en el caso de pegaptanib de sodio. El seguimiento fue de 6 meses. El tratamiento se llevó a cabo de conformidad con las Directrices de práctica clínica de la SERV (Sociedad Española de Retina y Vítreo).

La terapia anti-VEGF se administró en quirófano y un protocolo estéril para inyección intravítrea incluye: el uso de la solución al 5% de povidona yodada, la anestesia tópica, la aplicación párpado espéculo y la inyección intravítrea de ranibizumab (0,5 mg) o pegaptanib (0.3 mg). Se midió una distancia normal desde el limbo y hacia *pars-plana*, de 3,5 mm en ojos pseudofáquicos y de 4

mm en ojos fáquicos. Después del postoperatorio, se empleó un antibiótico tópico de tobramicina para disminuir el riesgo de infecciones oculares.

La extracción de sangre se realizó antes de la administración de la terapia anti-VEGF y a los 6 meses de tratamiento en el Hospital General Universitario Morales Meseguer. Las extracciones sanguíneas se realizaron de la vena antecubital en diferentes tubos según los parámetros bioquímicos. La sangre fue centrifugada a 3500 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener suero o plasma y los viales fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis. Las muestras fueron procesadas en el Hospital Universitario Morales Meseguer y en los laboratorios de la UCAM.

Se analizaron los siguientes parámetros (Tabla 6)

Tabla 6. Biomarcadores analizados en el grupo de pacientes con DMAE exudativa al inicio y tras 6 meses de tratamiento con pegaptanib y ranibizumab.

Riesgo cardiovascular	Inflamación	Estrés oxidativo
Colesterol total	PCR	Actividad total antioxidante
HDL		Glutación oxidado
LDL		Glutación reducido
Triglicéridos		Grupo carbonilo
Fibrinógeno		Glutación peroxidasa
Hcy		Glutación reductasa
		Superóxido dismutasa

Hcy: homocisteína; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; PCR: proteína C reactiva.

A los 73 pacientes se les extrajo una muestra de humor vítreo antes y después de la administración de la terapia anti-VEGF. Se obtuvo una muestra no

diluida de humor vítreo de un volumen aproximado de 0.3 mL que se aspiraron con una jeringa de 1 mL antes de la administración de la terapia anti-VEGF. Posteriormente se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

Al grupo control de 40 pacientes con membrana epirretiniana idiopática se les realizó la toma de muestra del humor vítreo en la cirugía.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas se describieron mediante la media, la desviación típica y los valores mínimo y máximo. Esta descripción se realizó para la muestra total y estratificada por grupo del estudio.

Las condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificaron previamente a los mismos. La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de alguna de las condiciones se procedió al análisis mediante pruebas no paramétricas.

Para las variables cuantitativas se desarrollaron comparaciones de t-Student en caso de normalidad y pruebas no paramétricas de U-Mann-Whitney en caso contrario.

La evolución de estas variables se analizó mediante pruebas paramétricas (t-Student o ANOVA), no paramétricas (Wilcoxon o Friedman) ó con el test de McNemmar según características propias de las variables en estudio.

En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizado fue $\alpha=0.05$.

El análisis estadístico se realizó con el software informático SPSS, versión 18.0.

5. RESULTADOS

5.1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LOS PACIENTES CON DMAE EXUDATIVA

5.1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON DEGENERACIÓN MACULAR EXUDATIVA

Muchos factores asociados con la DMAE están relacionados con los factores de RCV, la hipertensión, la obesidad¹⁵⁴, y la diabetes han sido significativamente asociados con el estadio inicial y avanzado de DMAE en varios estudios¹⁵²⁻¹⁵⁵. El diagnóstico de la hipertensión no tratada, el infarto de miocardio y el hábito de fumar se ha asociado en un incremento del riesgo precoz de inicio de DMAE¹⁵⁶.

Por otra parte, los pacientes con DMAE tardía presentan un 66% más de riesgo de padecer ECV, además de que pacientes con una fuerte predisposición genética a la DMAE tardía pueden tener una edad más temprana de inicio, son el grupo con mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares debido a factores genéticos¹⁵⁷. Es interesante que este hallazgo es consistente con los resultados en el Blue Mountains Eye Study, en el que DMAE tardía se asoció significativamente la mortalidad cardiovascular entre los participantes menores de 75 años de edad, pero no en los participantes de 75 años¹⁵⁸.

El reciente meta-análisis de Chakravarthy y cols.¹⁵⁹ ha investigado si algunos factores de RCV o algunas enfermedad cardiovascular pueden predecir el riesgo de desarrollar DMAE. Entre los factores de RCV, el tabaquismo, cirugía previa de cataratas, aumento de la edad e historia familiar de DMAE se observó una asociación significativa en el desarrollo de DMAE. Sin embargo, los resultados en las enfermedades cardiovasculares y el riesgo de DMAE fueron controvertidos. Clínicamente, se necesita más investigación para entender la posible asociación de DMAE y RCV.

Se han propuesto varios mecanismos para esta asociación como es la inflamación crónica. El hecho de que la activación de la cascada del complemento desempeña un papel en la formación de drusas¹⁶⁰, y la identificación de algunas de las variantes genéticas de las proteínas del complemento como factores de riesgo fuertes para DMAE refuerza el papel de la inflamación local en la patogénesis de la DMAE. Sin embargo, un reciente meta-análisis con una muestra de gran tamaño y alta potencia estadística no confirmó tal asociación, ni se encontró ninguna asociación entre DMAE y complemento del factor h y una

amplia gama de factores de riesgo de cardiopatía coronaria o biomarcadores excepto los triglicéridos¹⁶¹. Estos datos sugieren que la relación es probablemente más compleja.

La aterosclerosis también puede jugar un papel patogénico en el desarrollo de la DMAE debido a su efecto sobre la circulación coroidal y la deposición de lípidos en la membrana de bruch¹⁶². A este proceso puede contribuir la oxidación lipídica, cuyos productos se unirían a los macrófagos desencadenando la cascada inflamatoria en sentido descendente y resultando en lesiones ateroscleróticas¹⁶³.

Todo esto sugiere que DMAE es un trastorno complejo resultante de la interacción entre la inflamación, la aterosclerosis y el estrés oxidativo, y estos procesos patogénicos están relacionados con las enfermedades cardiovasculares.

5.1.1. Metodología de análisis de los factores de RCV

5.1.1.1. Toma de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas de la vena antecubital de cada sujeto, mediante punción intravenosa por personal sanitario autorizado. Fueron procesadas en los laboratorios de Hospital Universitario Morales Meseguer y en los Laboratorios de Nutrición Humana y Dietética de la Universidad Católica San Antonio (UCAM).

Los análisis bioquímicos se han realizado sobre plasma según los parámetros analizados.

5.1.1.2. Parámetros bioquímicos

5.1.1.2.1. Determinación de lípidos en plasma

Las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos, colesterol-HDL y colesterol-LDL, se determinaron en el servicio de análisis clínico del Hospital Universitario Morales Meseguer, de Murcia, por un facultativo especialista. Para cada determinación se utilizó un kit de Roche, excepto para el colesterol-LDL, que se calculó aplicando la fórmula de Friedewald. A

continuación se detalla la metodología seguida en cada test.

5.1.1.2.1.1. Colesterol Total.

La concentración de colesterol total se calculó utilizando un kit adecuado para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde el colesterol de la muestra se determina enzimáticamente por las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa.

Los ésteres de colesterol se desdoblan por acción de la colesterol esterasa (CE), a colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa (CO) cataliza luego la oxidación del colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno.

Bajo la acción catalítica de la peroxidasa (PO), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el fenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de colesterol, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

5.1.1.2.1.2. Triglicéridos

La concentración de triglicéridos se calculó utilizando un kit enzimático adecuado para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde los triglicéridos de la muestra se determinan enzimáticamente por las enzimas lipasa lipoproteica, glicerol kinasa y glicerol fosfato oxidasa.

Los triglicéridos se desdoblan, por la acción de la lipasa pancreática, a glicerol y ácidos grasos. En presencia de magnesio, el glicerol libre se fosforila por la glicerol kinasa (GK) a glicerol-3-fosfato y en presencia de oxígeno; el glicerol-3-fosfato se oxida por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno.

Bajo la acción catalítica de la PO, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el 4-clorofenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos, que se puede medir fotométricamente.

El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

5.1.1.2.1.3. Colesterol-HDL

La concentración de colesterol-HDL se calculó utilizando un kit adecuado para analizador automático de química Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde el colesterol-HDL de la muestra se determina enzimáticamente por las enzimas CE y CO acopladas a polietilenglicol (PEG) a los grupos amínicos.

En presencia del sulfato de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos solubles en agua con las partículas HDL, VLDL y quilomicrones (selectivamente en ese orden) otorgándoles una mayor reactividad frente a las enzimas modificadas por PEG.

A continuación la PEG-colesterol esterasa (PEG-CE) provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol-HDL a colesterol-HDL libre y ácidos grasos. En presencia de oxígeno, el colesterol-HDL se oxida por la PEG-colesterol oxidasa (PEG-CO) a Δ^4 -colesteno y peróxido de hidrógeno.

Bajo la acción catalítica de la PO, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-amino-antipirina y el HSDA para formar un colorante azul-purpúreo. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol-HDL, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

5.1.1.2.1.4. Colesterol-LDL

Por último la concentración de colesterol-LDL se calculó aplicando la fórmula de Friedewald:

$$LDL = CT - HDL - \frac{TG}{5}$$

CT: colesterol total

HDL: colesterol HDL

TG: triglicéridos

5.1.1.2.2. Homocisteína.

La mayor parte de la Hcy plasmática se encuentra unida a otros compuestos: unida a la albúmina, en forma homocisteína-disulfido, y en forma mixta de disulfido con cisteína. Antes de llevar a cabo la determinación de Hcy es necesario generar Hcy libre por reducción. Los niveles de Hcy se midieron en un analizador BN ProSpec® (de acuerdo con el protocolo suministrado en el kit de Siemens N Latex HCY OPAX 03).

La Hcy y las formas de Hcy presentes en la muestra se reducen y forman Hcy libre utilizando el ditioneitol (DTT). La Hcy libre se convierte en SAH (S-adenosil-L- Hcy) utilizando la SAH hidrolasa y exceso de adenosina. Por último, se produce la fase de inmuno-precipitación, con formación de inmunocomplejos solubles, cuya concentración es directamente proporcional a la concentración de Hcy en la muestra¹⁶⁴.

5.1.1.2.3. Proteína C-Reactiva

La PCR se analizó mediante inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) que utiliza partículas de látex recubiertas con un anticuerpo anti-Proteína C-Reactiva (AbPR) que se agregan en presencia de esta molécula en la muestra. El aumento de turbidez que acompaña a la agregación es proporcional a la concentración de PCR y se mide a 340 nm¹⁶⁵. Los reactivos utilizados, listos para su uso, son:

- Pocillos 1-3 (líquido): partículas recubiertas con anti-PCR, glicina, SDS, inhibidores microbianos (0.3 mg/mL-origen cabra).
- Pocillos 4-6 (líquido): tampón, PEG, inhibidores microbianos-98 mM.

5.1.1.2.4. Fibrinógeno.

Las estimaciones de fibrinógeno son derivadas de la tiempo de protrombina (PT-Fg)¹⁶⁶. El PT se determina por el cambio de densidad óptica para

una gama de soluciones de plasma con los niveles de fibrinógeno conocidos. El cambio óptico para cada nivel de fibrinógeno diferente se representa como una curva de calibración. Un PT se lleva a cabo en plasma pobre en plaquetas del paciente y el fibrinógeno se deriva a partir del cambio en la densidad óptica en comparación con la curva de calibración.

5.1.2. Perfil lipídico en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control

La hipercolesterolemia y las alteraciones del metabolismo lipídico son unos de los principales factores de RCV¹⁶⁷. Todos los estudios realizados para investigar el RCV y el perfil lipídico, concluyen que las personas que consumen grandes cantidades de colesterol y grasas saturadas tienen niveles de colesterol más elevados, así como una incidencia superior de enfermedades coronarias. Además, los bajos niveles de HDL, altos niveles de triglicéridos en sangre, como expresión de partículas LDL pequeñas y densas, son el componente habitual del denominado *síndrome metabólico* (junto con la presión arterial y la glucemia elevada, y la obesidad abdominal), que confiere un mayor RCV.

La prevalencia de la dislipemia es mayor en pacientes con enfermedad coronaria prematura, siendo tan alto como 75 a 85 por ciento en comparación con aproximadamente el 40 a 48 por ciento en los controles de la misma edad sin enfermedades del corazón. En el estudio INTERHEART, dislipidemia representó el 49 por ciento del riesgo atribuible a la población de un primer infarto de miocardio¹⁶⁸.

La normalización de las alteraciones del metabolismo lipídico y la reducción de la prevalencia de hipercolesterolemia, podría contribuir a modificar la estabilidad de las tasas de mortalidad cardio-isquémica y cerebrovascular, disminuyéndola de forma sustancial.

En los pacientes objeto de nuestro estudio, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con DMAE, observamos que los valores de perfil lipídico se encuentran dentro del rango de normalidad para la población adulta (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de perfil lipídico de pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.

Perfil lipídico	DMAE	PC	Valores de referencia
CT (mg/dL)	193.32±36.6	201,1±34.4	131.4–201.0
TG(mg/dL)	113.12±53.31	123.25±41.3	<150
HDL (mg/dL)	57.82±14.64	63.41±16.44	34.7–67.2
LDL (mg/dL)	112.88±30.43	119.52±38.8	83–130

DMAE: grupo de pacientes con degeneración macular exudativa; PC: población control; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad. Los valores representan la media \pm desviación estándar.

A pesar de que los parámetros analizados presentan unos valores ligeramente superiores en el grupo control que en el grupo de pacientes con DMAE, no se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos, y, como se ha comentado anteriormente, estos valores se encuentran dentro del rango de normalidad.

La asociación entre los lípidos séricos, como colesterol total, LDL y triglicéridos y DMAE, ha sido objeto de numerosas investigaciones, aunque con resultados contradictorios. En 1992, el Grupo de Estudio de Enfermedades Oculares Caso-Control¹⁶⁹, indicó que una elevación de los niveles de colesterol sérico implicaba un aumento del riesgo de DMAE exudativa de hasta un 25%. Desde entonces, sólo cinco estudios han encontrado una relación significativa entre el aumento del colesterol total y el riesgo de DMAE¹⁷⁰⁻¹⁷³, mientras que 13 estudios encontraron una asociación no significativa^{153,174-179}. En un estudio reciente¹⁸⁰, se muestra que no hay asociación significativa entre el perfil lipídico (colesterol total, LDL y triglicéridos) y la DMAE, resultados estos que coinciden con los obtenidos en nuestro estudio.

Respecto a los niveles de HDL también existe controversia sobre su implicación en el mecanismo patogénico de la DMAE, ya que existen estudios que indican una implicación directa^{181,182} y otros no^{159,183}. Nowak y cols¹⁷¹ encontraron una disminución significativa de la concentración de HDL en pacientes con DMAE, en nuestro caso, a pesar de que las diferencias no son significativas entre de los dos grupos, los valores de HDL en el grupo de pacientes con DMAE son ligeramente inferiores.

Algunos estudios sugieren que las concentraciones de HDL en plasma no predicen la funcionalidad y la composición de HDL¹⁸⁴ y pueden ser un factor potencial de resultados contradictorios en la literatura¹⁸⁵. El HDL puede convertirse en partículas disfuncionales, pro-inflamatorias y pro-oxidantes, que promueven la oxidación de LDL y afectan la salida del colesterol y el transporte reverso de colesterol. Por lo tanto, los estudios recientes sugieren que la funcionalidad de las pruebas, la composición (tales como la concentración de las subfracciones de HDL) y propiedades anti-inflamatorias de HDL son mejores marcadores que la concentración de HDL en plasma, para identificar sujetos en riesgo de enfermedad cardiaca coronaria^{184,185}.

5.1.3. Valores de homocisteína plasmática en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control

La Hcy tiene propiedades aterogénicas y protrombóticas primarias. Las características histopatológicas de la lesión vascular inducida por la Hcy incluyen el engrosamiento de la íntima, la interrupción de la lámina elástica, hipertrofia del músculo liso, marcada acumulación de plaquetas, y la formación de trombos de plaquetas¹²². La evidencia experimental y clínica sugiere que la hHcy moderada puede predisponer además, a la disfunción endotelial a través de un mecanismo que implica la generación de ROS.

Un meta-análisis realizado por los Servicios Preventivos de los EE.UU¹⁸⁶ que examinó el valor predictivo de la Hcy sobre el riesgo de cardiopatía coronaria en adultos sin enfermedad coronaria conocida, encontró que, independientemente de los factores de riesgo de Framingham, cada incremento del nivel de Hcy de 5 $\mu\text{mol/L}$ aumenta un 20% el riesgo de eventos

cardiovasculares.

En nuestro estudio encontramos que los valores medios de homocisteína plasmática fueron significativamente mayores en los pacientes con DMAE ($P < 0.01$) (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de Hcy en pacientes con DMAE exudativa y grupo control.

	DMAE	PC	Valores de referencia
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	13.66 \pm 1.47**	10.35 \pm 1.72	<5–12

Hcy: homocisteína plasmática; DMAE: grupo de pacientes con degeneración macular exudativa; PC: población control. Los valores representan la media \pm desviación estándar.

** $p \leq 0.01$ diferencia significativas entre los dos grupos.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios que encuentran una asociación significativa entre la hHcy y la DMAE^{88,137,138}. Ghosh y cols.¹⁸⁷ mostraron que el 83.3% de los pacientes con DMAE exudativa, 80% en DMAE atrófica y 37% grupo control, presentaban hHcy.

En nuestro estudio obtenemos unos valores de Hcy en pacientes con DMAE exudativa situada en rango moderado de hHcy, ligeramente inferior a los obtenidos en otros estudios¹⁴² (15 \pm 6 $\mu\text{mol/L}$) y superiores a los encontrados en por otros autores¹³⁷ (10 $\mu\text{mol/L}$). Además, los pacientes que participaron en el estudio, tanto en el grupo con DMAE exudativa como en el grupo control, no han tomado ningún tipo de complejo vitamínico u otro tipo de suplemento que puedan modificar y/o falsear los valores analíticos de la Hcy.

5.1.4. Valores de la PCR en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.

La PCR es la más consistente de varios biomarcadores de inflamación en la predicción de RCV. Además de ser un biomarcador sensible de la inflamación, la PCR puede tener importancia fisiopatológica directa a través de su capacidad para inducir la activación del complemento.

Cuando analizamos los valores de la PCR encontrados en nuestro estudio, observamos que éstos valores son más altos en los pacientes con DMAE exudativa, encontrando diferencias significativas entre ambos grupos. ($P < 0,01$) (Tabla 9)

Tabla 9. Valores de PCR en pacientes con DMAE exudativa y grupo control.

	DMAE	PC	Valores de referencia
PCR (mg/dL)	0.85±0.09**	0.14±0.07	>0.1

DMAE: grupo de pacientes con degeneración macular exudativa; PC: población control; PCR: proteína C-reactiva. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. ** $p \leq 0.01$ diferencia significativas entre los dos grupos.

Varios meta análisis han encontrado una relación significativa entre la PCR basal y la enfermedad coronaria o los eventos cardiovasculares^{188,189}. La escala de Framingham indica que el valor de referencia de la PCR para aumentar considerablemente el RCV es de >3 mg/l (0.3 mg/dl) y que valores <1mg/l (0.1 mg/dl) presentan menor riesgo¹⁹⁰.

Los resultados de estudios transversales previos sobre la asociación entre la PCR y DMAE han sido inconsistentes^{191,192}, aunque algunos indican¹⁹³ una correlación positiva entre la PCR y DMAE en la DMAE precoz. A pesar de esto, si los procesos inflamatorios son una causa de la DMAE precoz, no se sabe si las intervenciones que reducen los procesos inflamatorios sistémicos reducen su incidencia¹⁹⁵. Un estudio sugiere que los niveles elevados de PCR en pacientes con DMAE neovascular son, al menos en parte, explicados por la inactividad física, por tanto, sería un factor posiblemente modificable¹⁹⁶.

Algunos estudios estiman que con valores de PCR elevados se podría calcular la incidencia de DMAE. Por ejemplo: Un estudio encontró un 90% de aumento en la incidencia de DMAE entre las mujeres con PCR > 3 mg/L. Boekhoorn y cols¹⁹⁷ observaron un 40% de mayor incidencia de DMAE temprana

entre las personas con PCR > 3,26 mg/L y un 80% de aumento en la incidencia de casos de DMAE tardía (DMAE neovascular y atrofia geográfica central) entre las personas con PCR > 3,23 mg/L. Estudios de 5 cohortes prospectivas añaden más evidencia de que los niveles elevados de PCR predicen un mayor riesgo futuro de DMAE.

Esta información podría arrojar luz sobre los mecanismos subyacentes, y podría ser de utilidad clínica en la identificación de pacientes con alto riesgo de DMAE que podrían beneficiarse de una mayor adherencia a las recomendaciones de estilo de vida, la periodicidad de los exámenes oculares, y los protocolos terapéuticos¹⁹⁸. Tanto la Hcy y la PCR se asocian con el RCV pudiendo ser que estos dos biomarcadores reflejan el mismo estado de la enfermedad cardiovascular subyacente.

5.1.5. Valores de fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.

La liberación de la fibrina en respuesta a una agresión es seguida por la exudación inflamatoria celular, la proliferación de células de tejido epitelial y conectivo, la angiogénesis y la producción de matriz extracelular. Además, este proceso está implicado en la liberación de factores de crecimiento favoreciendo la neovascularización.

El fibrinógeno es un factor hemostático y una proteína proinflamatoria de fase aguda que podría afectar posiblemente el riesgo de AMD a través de reducciones en el flujo de sangre coroidal¹⁹⁹, los efectos directos sobre la pared vascular, u otros efectos de la inflamación crónica, aunque puede ser simplemente un marcador de riesgo.

Los valores de fibrinógeno encontrados en nuestro estudio muestran diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$), destacando valores más altos en el grupo de DMAE que en el grupo control. En ambos grupos los valores estaban en rango de normalidad para la población sana. (Tabla 10)

Tabla 10. Valores de fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa vs grupo control.

	DMAE	PC	Valores de referencia
Fibrinógeno (g/L)	3.56±0.67*	2.76±0.31	2-4.5

DMAE: grupo de pacientes con degeneración macular exudativa; PC: población control. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. ** $p \leq 0.05$ diferencia significativas entre los dos grupos.

El fibrinógeno se ha identificado en drusas y la membrana de Bruch²⁰⁰, y la evidencia epidemiológica previa de los estudios transversales apoyan la relación entre valores altos de fibrinógeno y DMAE^{183,201-203}. En estos estudios se observó un aumento significativo en el riesgo de DMAE tardía con un aumento de fibrinógeno en plasma y hubo sólo una estimación a partir de un estudio prospectivo que no apoyó este hallazgo¹⁵³.

Un estudio²⁰⁴ que analizó marcadores de trombosis sistémicas (entre ellos el fibrinógeno) en DMAE no encontró asociación entre ellos, aunque destaca que algunos de estos factores de inflamación están relacionados con marcadores de trombosis arterial. Además, el fibrinógeno se considera como un factor de riesgo secundario para la patogénesis de la enfermedad DMAE¹⁵⁹.

**5.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTI-VEGF
SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO
CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON DMAE
EXUDATIVA**

5.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTI-VEGF SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON DMAE EXUDATIVA

La DMAE exudativa se caracteriza por el crecimiento de nuevos vasos coroideos en el espacio subretiniano, causando la exudación y la hemorragia que dañan los fotorreceptores y deterioran la visión central. La molécula VEGF juega un papel clave en este proceso aumentando la neovascularización de la DMAE²⁰⁵.

El VEGF está implicado en procesos aterotrombóticos mediante dos vías. En primer lugar produce un efecto positivo porque puede inducir el desarrollo de la circulación colateral protegiendo contra la isquemia (estrechamiento de los vasos normales)²⁰⁶. Sin embargo, la segunda vía de acción es negativa, ya que puede promover la génesis de microvasos dentro de la placa aterosclerótica, aumentando la probabilidad de hemorragia intraplaca y trombosis, pudiendo causar síndromes isquémicos agudos (ictus o infarto de miocardio)²⁰⁷.

VEGF es el principal regulador de la angiogénesis y actúa como un factor de supervivencia para las células endoteliales, previniendo la apoptosis mediante la inducción de proteínas antiapoptosis²⁰⁸. Además, tiene actividad mitogénica sobre las diferentes células (como en las células epiteliales retinianas), interviene en la tasa de reendotelización, en la cascada de coagulación, y aumenta la permeabilidad vascular a través de una respuesta dependiente de NO. También promueve la restauración del endotelio dañado, protege contra el desarrollo de aterotrombosis, y juega un papel en la regulación de la presión arterial (induce la vasodilatación)²⁰⁹.

El uso de inhibidores de VEGF en DMAE podría teóricamente estar asociado con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares. Aunque el ojo es una zona relativamente aislada de la circulación sistémica, esta barrera es frecuentemente interrumpida en trastornos neovasculares oftálmicos. De hecho, estos agentes pueden ser detectables en el plasma después de la administración intraocular en ensayos realizados en animales de experimentación y en humanos

En las fichas técnicas de los anti-VEGF utilizados en el estudio se recoge la siguiente información sobre efectos adversos cardiovasculares:

- Ranibizumab: existe un riesgo teórico de acontecimientos tromboembólicos arteriales, incluyendo accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. En los ensayos clínicos con Lucentis® se observó una incidencia baja de acontecimientos tromboembólicos arteriales en pacientes con DMAE.
- Pegaptanib: efectos adversos cardiacos (palpitaciones) y vasculares (hipertensión, aneurisma aórtico) clasificándose como poco frecuentes.

Aunque los estudios clínicos realizados muestran resultados contradictorios, la mayoría de ellos no muestran un aumento importante del RCV tras la inyección de los anti-VEGF. Sin embargo, especifican que es conveniente realizar un balance beneficio-riesgo, sobre todo en pacientes con elevado RCV, y destacan que existe un RCV teórico.

El objetivo de este capítulo es determinar el perfil lipídico, Hcy, PCR y fibrinógeno en pacientes con DMAE tras el tratamiento anti-VEGF. Destacamos la novedad de nuestro estudio porque todavía no existen estudios que evalúen los posibles efectos adversos cardiovasculares antes y tras la administración de la terapia anti-VEGF mediante parámetros bioquímicos.

(Ambos fármacos tienen la indicación aprobada en ficha técnica de la AEMPS y EMA).

5.2.1. Metodología de análisis de los factores de RCV.

5.2.1.1. Metodología y muestra poblacional

Los 73 pacientes con DMAE exudativa nunca habían recibido tratamiento previo con anti-VEGF y se les dividió aleatoriamente en dos grupos:

- 37 pacientes recibieron 0,3 mg de Pegaptanib (Macugen®).

-36 pacientes recibieron 0,5 mg de Ranibizumab (Lucentis®).

El ranibizumab se administró cada 4 semanas y cada 6 semanas en el caso de pegaptanib de sodio. El seguimiento fue de 6 meses. El tratamiento se llevó a cabo de conformidad con las Directrices de práctica clínica de la SERV (Sociedad Española de Retina y Vítreo).

(En el apartado 4.2.2. explicamos en profundidad la administración de la terapia anti-VEGF en la sala de operaciones)

5.2.1.2. Toma de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas de la vena antecubital de cada sujeto, mediante punción intravenosa por personal sanitario autorizado. Fueron procesadas en los laboratorios de Hospital Universitario Morales Meseguer y en los Laboratorios de Nutrición Humana y Dietética de la UCAM.

Se obtuvieron dos muestras: la primera, antes de iniciar la terapia anti-VEGF y la segunda tras la administración de la inyección anti-VEGF (6 meses tras la primera muestra sanguínea).

Los análisis bioquímicos se han realizado sobre plasma según los parámetros analizados.

5.2.1.3. Parámetros bioquímicos

5.2.1.3.1. Determinación de lípidos en plasma

Las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos, colesterol-HDL y colesterol-LDL, se determinaron en el servicio de análisis clínico del Hospital Universitario Morales Meseguer, de Murcia, por un facultativo especialista. Para cada determinación se utilizó un kit de Roche, excepto para el colesterol-LDL, que se calculó aplicando la fórmula de Friedewald. A continuación se detalla la metodología seguida en cada test.

5.2.1.3.1.1. Colesterol Total

La concentración de colesterol total se calculó utilizando un kit adecuado

para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde el colesterol de la muestra se determina enzimáticamente por las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa.

Los ésteres de colesterol se desdoblan por acción de la colesterol esterasa (CE), a colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa (CO) cataliza luego la oxidación del colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno.

Bajo la acción catalítica de la peroxidasa (PO), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el fenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de colesterol, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

5.2.1.3.1.2. Triglicéridos

La concentración de triglicéridos se calculó utilizando un kit enzimático adecuado para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde los triglicéridos de la muestra se determinan enzimáticamente por las enzimas lipasa lipoproteica, glicerol kinasa y glicerol fosfato oxidasa.

Los triglicéridos se desdoblan, por la acción de la lipasa pancreática, a glicerol y ácidos grasos. En presencia de magnesio, el glicerol libre se fosforila por la glicerol kinasa (GK) a glicerol-3-fosfato y en presencia de oxígeno; el glicerol-3-fosfato se oxida por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno.

Bajo la acción catalítica de la PO, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el 4-clorofenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

5.2.1.3.1.3. Colesterol-HDL

La concentración de colesterol-HDL se calculó utilizando un kit adecuado para analizador automático de química Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde el colesterol-HDL de la muestra se determina enzimáticamente por las enzimas CE y CO acopladas a polietilenglicol (PEG) a los grupos amínicos.

En presencia del sulfato de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos solubles en agua con las partículas HDL, VLDL y quilomicrones (selectivamente en ese orden) otorgándoles una mayor reactividad frente a las enzimas modificadas por PEG.

A continuación la PEG-colesterol esterasa (PEG-CE) provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol-HDL a colesterol-HDL libre y ácidos grasos. En presencia de oxígeno, el colesterol-HDL se oxida por la PEG-colesterol oxidasa (PEG-CO) a Δ^4 -colesteno y peróxido de hidrógeno. Bajo la acción catalítica de la PO, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminoantipirina y el HSDA para formar un colorante azul-purpúreo. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol-HDL, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

5.2.1.3.1.4. Colesterol-LDL

Por último la concentración de colesterol-LDL se calculó aplicando la fórmula de Friedewald:

$$LDL = CT - HDL - \frac{TG}{5}$$

CT: colesterol total

HDL: colesterol HDL

TG: triglicéridos

5.2.1.3.1.5. Apoproteína A

Se utilizó el kit N "Antisera to Human Apolipoproteína A-II and

Apolipoproteína E'' con los sistemas BN (BN es una marca comercial de Siemens Healthcare Diagnostics). Los N antisueros son de origen animal. El N antisuero contra la Apo-A-II humana se produce mediante inmunización de conejos con Apo-A-II humana de alta pureza.

Las proteínas contenidas en una muestra de suero humano forman inmunocomplejos en una reacción inmunoquímica con anticuerpos específicos. Estos complejos dispersan un haz de luz proyectado a través de la muestra. La intensidad de la luz dispersada es proporcional a la concentración en la proteína de la muestra en cuestión. El resultado se evalúa en comparación con un estándar de concentración conocida.

5.2.1.3.2. Homocisteína

La mayor parte de la Hcy plasmática se encuentra unida a otros compuestos: unida a la albúmina, en forma homocisteína-disulfido, y en forma mixta de disulfido con cisteína. Antes de llevar a cabo la determinación de Hcy es necesario generar Hcy libre por reducción. Los niveles de Hcy se midieron en un analizador BN ProSpec ® (de acuerdo con el protocolo suministrado en el kit de Siemens N Latex HCY OPAX 03).

La Hcy y las formas de Hcy presentes en la muestra se reducen y forman Hcy libre utilizando el ditioneitol (DTT). La Hcy libre se convierte en SAH (S-adenosil-L- Hcy) utilizando la SAH hidrolasa y exceso de adenosina. Por último, se produce la fase de inmuno-precipitación, con formación de inmunocomplejos solubles, cuya concentración es directamente proporcional a la concentración de Hcy en la muestra¹⁶⁴.

5.2.1.3.3. Proteína C-Reactiva

La PCR se analizó mediante inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) que utiliza partículas de látex recubiertas con un anticuerpo anti-Proteína C-Reactiva (AbPR) que se agregan en presencia de esta molécula en la muestra. El aumento de turbidez que acompaña a la agregación es proporcional a la concentración de PCR y se mide a 340 nm¹⁶⁵. Los reactivos utilizados, listos para su uso, son:

- Pocillos 1-3 (líquido): partículas recubiertas con anti-PCR, glicina, SDS, inhibidores microbianos (0.3 mg/mL-origen cabra).

- Pocillos 4-6 (líquido): tampón, PEG, inhibidores microbianos-98 mM.

5.2.1.3.4. Fibrinógeno

Las estimaciones de fibrinógeno son derivadas de la tiempo de protrombina (PT-Fg)¹⁶⁶. El PT se determina por el cambio de densidad óptica para una gama de soluciones de plasma con los niveles de fibrinógeno conocidos. El cambio óptico para cada nivel de fibrinógeno diferente se representa como una curva de calibración. Un PT se lleva a cabo en plasma pobre en plaquetas del paciente y el fibrinógeno se deriva a partir del cambio en la densidad óptica en comparación con la curva de calibración.

5.2.1.4. Los efectos adversos

Después de los 6 meses, no se registró ningún efecto adverso ocular o sistémico en la muestra de pacientes. Además tampoco se registraron aumento de presión arterial, reacciones de inflamación, endoftalmitis, desprendimiento de retina y/o hemorragias vítreas.

Ningún paciente tuvo ningún episodio de RCV o cerebrovascular durante el estudio.

5.2.2. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre perfil lipídico en pacientes con DMAE exudativa

Se ha demostrado que la inyección intravítrea de anti-VEGF puede inducir una vasoconstricción retiniana en pacientes con DMAE²¹² debido a una disminución en la síntesis de NO, causando edema secundario por la oclusión venosa de la retina.^{213,214} La inhibición de VEGF sistémica puede alterar la homeostasis endotelial y acelerar la aterogénesis causando eventos cardiovasculares²¹⁵. Además, la inhibición del efecto vasodilatador de VEGF puede desencadenar isquemia miocárdica coronaria en un paciente con

enfermedad coronaria silente²¹⁶. Es muy importante conocer los posibles efectos adversos derivados de la terapia anti-VEGF y sobretodo, destacar los posibles efectos cardiovasculares.

Cuando comparamos el perfil lipídico de los dos grupos de nuestro estudio, encontramos que en ambos grupos los valores de estos parámetros están dentro del rango normal para la salud establecido para la población sana, tanto al inicio del estudio como tras la terapia anti-VEGF. Estos valores de lípidos séricos determinados en los pacientes con DMAE exudativa según la terapia anti-VEGF recibida (Pegaptanib o Ranibizumab) se exponen en la siguiente Tabla 11.

Tabla 11. Valores de perfil lipídico en pacientes con DMAE exudativa antes y después del tratamiento con Pegaptanib y Ranibizumab.

Parámetro	Pegaptanib		Ranibizumab	
	Inicio	Final	Inicio	Final
CT (mg/dL)	186.2±32.9	184.7±51.7	209.4±40	196.7±56.4
TG (mg/dL)	89.05±3.5	84.31±2.3	109.6±8.5	109.47±4.3
HDL (mg/dL)	56.7±1.3	57.09±1.2	59.06±16.3	59.75±16.43
LDL (mg/dL)	105.4±2.1	109.4±2.9	121.08±37.74	123.76±24.3
Apo A (mg/dL)	153.6±17.51	158.9±19.29	156.8±34.82	159.85±16.23

DMAE: grupo de pacientes con degeneración macular exudativa; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; ApoA: Apolipoprotein A. Los valores representan la media ± desviación estándar.

En ficha técnica de Ranibizumab, no se recogen datos sobre la seguridad metabólica o endocrina pero en la base informática-científica de Uptodate, Ranibizumab está asociado a hipercolesterolemia (3-7%), sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado ninguna asociación.

En ficha técnica y en Uptodate sobre Pegaptanib no se encuentran datos respecto a los efectos adversos sobre el perfil lipídico. Además, hasta la fecha no hay estudios clínicos publicados sobre el efecto de los anti-VEGF a nivel lipídico, pero si hay estudios sobre el riesgo aterotrombótico, cardiovascular y cerebrovascular.

5.2.3. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la homocisteína en pacientes con DMAE exudativa

El análisis de algunos biomarcadores como la Hcy es de gran utilidad clínica para la detección del riesgo cardiovascular.

En el capítulo 5.1 observamos que existía una asociación significativa entre los niveles de hHcy y DMAE. Al analizar si el tratamiento con terapia anti-VEGF (Pegaptanib o Ranibizumab) afecta a los valores de Hcy plasmática en los pacientes con DMAE, encontramos que en ambos grupos no se aprecian variaciones en los valores de Hcy en plasma tras los 6 meses de tratamiento con pegaptanib y ranibizumab intravítrea (tabla 12).

Tabla 12. Valores de homocisteína plasmática en pacientes con DMAE exudativa antes y después del tratamiento con Pegaptanib y Ranibizumab..

	Pegaptanib		Ranibizumab	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Hcy (μmol/L)	13.1±4.2	13.59±1.35	12.8±2.5	12.32±1.7

Hcy: homocisteína plasmática; DMAE: grupo de pacientes con degeneración macular exudativa. Los valores representan la media ± desviación estándar.

5.2.4. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la PCR en pacientes con DMAE exudativa

En consonancia con el papel de la inflamación crónica en la patogénesis de DMAE, varios mediadores inflamatorios, incluyendo los componentes del complemento, quimioquinas y citoquinas presentan valores elevados, tanto a nivel local como sistémico en pacientes con DMAE²²². Estos mediadores tienen diversas funciones en la vía alternativa del complemento, incluyendo el reclutamiento de células inflamatorias, la promoción de la neovascularización y en la resolución de la inflamación.

La utilidad de los biomarcadores inflamatorios en la evaluación de riesgo individual y la progresión de la enfermedad es controvertida. Sin embargo, la comprensión del papel de estos mediadores inflamatorios en el inicio del diagnóstico, la progresión y la respuesta al tratamiento puede aumentar nuestro conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y proporcionar opciones terapéuticas en el futuro.

Los valores de PCR en pacientes con DMAE exudativa según la terapia anti-VEGF recibida (Pegaptanib o Ranibizumab) se exponen en la siguiente Tabla 13.

Tabla 13. Valores de Proteína C-reactiva plasmática en pacientes con DMAE exudativa antes y después del tratamiento con Pegaptanib y Ranibizumab.

	Pegaptanib		Ranibizumab	
	Inicio	Final	Inicio	Final
PCR (mg/dL)	0.49±0.02	0.51±0.03	0.50±0.11	0.52±0.08

DMAE: grupo de pacientes con degeneración macular exudativa; PC: población control; PCR: proteína C-reactiva. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

Sólo 3 de los pacientes del estudio presentaban inicialmente valores de PCR por encima de la normalidad, presentando el resto de los pacientes unos valores de PCR plasmática normales.

Tras la terapia con pegaptanib y ranibizumab, encontramos un aumento significativo de estos valores en los pacientes en los que inicialmente ya eran altos. Sin embargo, en los pacientes que al inicio del estudio presentaban valores de la PCR plasmática en el rango de normalidad para la población sana, la terapia antiangiogénica no produjo variaciones significativas.

Según la escala de Framingham y de acuerdo con la *American Heart Association*, el valor de referencia de la PCR para un elevado riesgo cardiovascular es el valor superior a 3 mg/L (0.3 mg/dL). En nuestro caso, obtenemos un valor medio en torno a 0.5 mg/dL y por lo tanto, un elevado RCV, aunque para calcular el RCV total deberíamos valorar otros parámetros y situaciones clínicas del paciente. Necesitamos más estudios similares al nuestro para poder comparar valores y poder extraer conclusiones.

5.2.5. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre el fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa

La relación entre hiperfibrinogenemia, aterosclerosis y trombosis es compleja. Ciertos factores trombotogénicos, como el fibrinógeno, tendrían

importancia en el proceso de patogenia de la aterosclerosis con efectos sobre enfermedades cardiovasculares.

La evidencia clínica empírica sugiere que la supresión sistémica de la actividad VEGF puede retrasar la cicatrización de las heridas, causar hipertensión, eventos tromboembólicos, infarto de miocardio y síndrome nefrótico. Además, la edad aumenta significativamente la oportunidad de eventos cardiovasculares como la isquemia miocárdica y eventos tromboembólicos.

Los valores de fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa según la terapia anti-VEGF recibida (Pegaptanib o Ranibizumab) se exponen en la siguiente Tabla 14.

Tabla 14. Valores de fibrinógeno en pacientes con DMAE exudativa antes y después del tratamiento con Pegaptanib y Ranibizumab.

	Pegaptanib		Ranibizumab	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Fibrinógeno (g/L)	3.3±0.23	3.5±0.13	3.7±0.12	4.02±0.34

DMAE: grupo de pacientes con degeneración macular exudativa. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

Los resultados fueron similares en ambos tratamientos antiangiogénicos y están en rango terapéutico (2-4 g/L) tanto al inicio como al final del estudio. Los resultados mostraron un ligero aumento de los niveles de fibrinógeno en ambos grupos, aunque no se observaron diferencias significativas.

Debido a que no hay estudios que indiquen valores de riesgo cardiovascular al inicio y tras la administración de la terapia intravítrea, hemos recopilado los estudios más representativos sobre anti-VEGF y posible RCV en pacientes diagnosticados de DMAE exudativa.

Respecto a pegaptanib y tras 2 años de administración continuada, Ueta et al²¹⁷ no encontraron efectos colaterales sistémicos ni incidencia de accidentes cardiovasculares. Esto podría ser debido al bloqueo selectivo de pegaptanib a VEGF-165 y por tanto, podría indicar una mayor seguridad clínica respecto a otras terapias anti-VEGF. Sin embargo, habría que realizar más estudios clínicos sin sesgos ya que este estudio excluyó a pacientes con RCV. Singerman et al²¹⁸ observó en una muestra de 161 pacientes que no hubo una mayor incidencia de accidentes cerebrovasculares. Solamente, dos pacientes experimentaron infarto de miocardio (2%) y otro, angina de pecho (1%). Además, la tasa de eventos cardiovasculares fue similar a otra cohorte de 422 pacientes.

Respecto a ranibizumab y tras 2 años de administración continuada, el estudio MARINA²²³ mostró que el porcentaje de eventos tromboembólicos fue ligeramente superior en pacientes tratados con ranibizumab respecto al grupo control. Sin embargo, el estudio PIER²²⁴ indicó que la incidencia de mortalidad, eventos trombóticos y efectos adversos graves fue similar en el caso de ranibizumab y grupo control.

En el estudio EXCITE²²⁵, en el que se administro 0.3 mg ranibizumab mensualmente durante 1 año (12 inyecciones) y 0.5 mg trimestralmente (5.5 inyecciones), los eventos trombóticos arteriales fueron de un 2% pero tuvo mejor evolución visual clínica el administrado mensualmente. En el estudio SUSTAIN²²⁶ (estudio de ranibizumab en pacientes con neovascularización coroidal subfoveal secundaria a DMAE), en 513 pacientes (media de inyecciones 5.6 por año) registraron una mayor tasa de efectos adversos (14.2%). Aproximadamente un 10% de los pacientes quienes habían sufrido un accidente cerebrovascular sufrieron otro en los 12 primeros meses de la terapia, mostrando que ranibizumab puede incrementar la incidencia de accidente cerebrovascular²²⁷. La tasa de eventos adversos sistémicos trombóticos en SUSTAIN fueron similares a las de MARINA y ANCHOR con una dosis de 0.5 mg ranibizumab. Sin embargo, SAILOR²²⁸ obtuvo menor tasa de eventos cardiovasculares (en torno a 0.6-1.2%) pero la FDA lo criticó sugiriendo que había infraestimado los efectos sistémicos y seleccionados los pacientes con buena salud y sin RCV.

Un metaanálisis²²⁹ de ranibizumab mostró que la tasa de eventos tromboembólicos arteriales fue similar, aunque parece ser ligeramente más frecuentes en pacientes con dosis más elevadas de ranibizumab. Además, acentúa que los pacientes con elevado RCV tienen una mayor incidencia de RCV tras la administración de ranibizumab²³⁰. Evaluaron los datos de 859 personas tratadas mensualmente durante 2 años, mostrando que ranibizumab estaba asociado con una alta incidencia de eventos cerebrovasculares pero no infartos de miocardios²³¹.

El estudio HORIZON²³² se trata de un estudio de 2 años de seguimiento de pacientes que completaron MARINA, ANCHOR y FOCUS, en el cual se administró las inyecciones según el clínico con una media de 4.4 inyecciones. Obtuvo una tasa de eventos tromboembólicos arteriales en torno a 5.3%. Además, esta tasa coincide con el estudio SECURE²³³ (estudio de extensión fase IV en el cual hubo una selección de 210 pacientes previamente incluidos en el EXCITE y SUSTAIN fueron dirigidos durante 3 años con ranibizumab^{225,226}).

Como podemos observar que todavía hay mucha controversia e incertidumbre.

Las opiniones expertas indican que la evaluación observada en los estudios clínicos más relevantes, la tasa de infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares y muerte en pacientes que habían recibido terapia anti-VEGF fue similar a los pacientes que no habían recibido terapia anti-VEGF^{217,219}. Además, la tasa de riesgo trombótico parece suficientemente baja comparada con la incidencia natural en pacientes con edad avanzada, y presenta gran ventaja en la mejora de la visión²²⁰. Por otro lado, la tasa de mortalidad no es mayor aunque si indican la posible asociación entre los eventos adversos cardiovasculares y la terapia anti-VEGF²²¹.

Quizás las dosis usadas en enfermedades oculares al ser pequeñas pueden garantizar la efectividad y seguridad de estos fármacos aunque atraviesen la barrera retina-sanguínea. Es necesario más estudios para sacar conclusiones sobre la novedosa terapia anti-VEGF y la seguridad de estos fármacos.

**5.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTI-
VEGF SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRÉS
OXIDATIVO EN PACIENTES CON DMAE
EXUDATIVA**

5.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTI-VEGF SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON DMAE EXUDATIVA

La DMAE es una enfermedad crónica asociada con factores ambientales, de estilo de vida y genéticos. El estrés oxidativo y la producción de ROS parecen jugar un papel fundamental en la patogénesis de la DMAE.

La respuesta al estrés oxidativo implica varias reacciones de defensa celular, por ejemplo, el aumento en la producción de agentes antioxidantes y la proteólisis de las proteínas dañadas.

Hay muchos cambios anatómicos en el EPR, en la membrana de Bruch y en la membrana coriocapilar en respuesta al estrés oxidativo crónico, la hipoxia y la alteración de la autofagia. Estas alteraciones están asociadas a los procesos neovasculares en la DMAE²³⁴ (Figura 5).

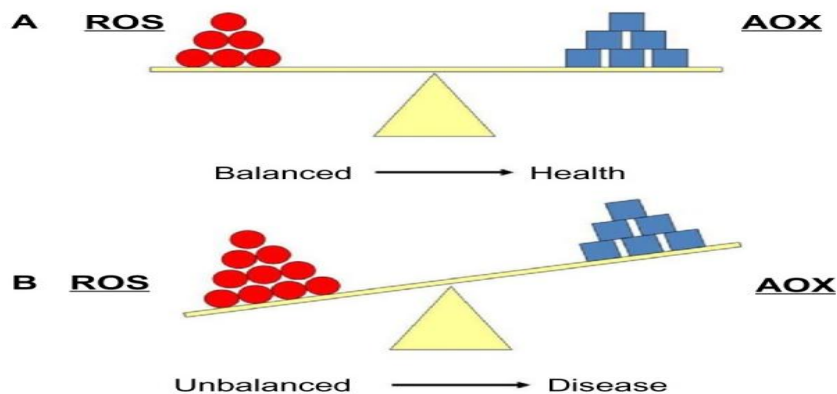


Figura 5. A. Equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los agentes antioxidantes (AOX) B. Desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los agentes antioxidantes que se produce en los pacientes con DMAE²³⁴.

El daño oxidativo de los componentes celulares desempeña un papel importante en el proceso de senescencia³⁶. Se incrementa con la edad debido a alteraciones (ineficacia) en el sistema de reparación del ADN y acelera el envejecimiento del organismo. El envejecimiento es inevitable ya que la formación de ROS es consecuencia del metabolismo celular. Por lo tanto, las células han desarrollado mecanismos de defensa complejos para combatir tanto la formación de ROS como las consecuencias de sus acciones.

La mácula está constantemente expuesta a una alta tasa metabólica que promueve un mayor estrés oxidativo debido a la elevada presión parcial y la elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Los AGPI oxidados no se hidrolizan de manera eficiente en los lisosomas de las células del RPE de personas de edad avanzada y llegan a depositarse en forma de lipofuscina.

La lipofuscina es un cromóforo con un papel fotosensibilizador en el RPE. Después de absorber un fotón de alta energía, en especial la de la luz azul, se producen una serie de reacciones fotoquímicas que aumentan la formación de ROS, con el consiguiente daño fotoquímico en las células de la retina y RPE. Estas alteraciones inducen la formación de drusas entre las células del RPE y la membrana de Bruch provocando un empeoramiento de la DMAE²³⁵.

(En el apartado 3.4.1. se han descrito las rutas y mecanismos de estrés oxidativo asociados a la DMAE)

La inhibición de los VEGF puede alterar la homeostasis de la vasculatura normal y aumentar la formación de ROS²³⁶. A pesar de resultados alentadores en la detención de la enfermedad y la mejora de la visión, las inyecciones intravítreas de agentes anti-VEGF pueden estar asociadas con efectos adversos sistémicos y oculares²³⁷. Dada la expresión de los VEGF y sus receptores en la retina de adultos, y la activación constitutiva del receptor, diversos investigadores plantearon la hipótesis de que los VEGF juegan un papel importante en el mantenimiento y la función de la retina de adultos y que los agentes anti-VEGF pueden anular la función fisiológica y neutralizar el papel de neuroprotección de los VEGF²³⁷.

El objetivo de este capítulo es determinar la actividad antioxidante total, la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) y biomarcadores de estrés oxidativo como son los grupos carbonilo, y el cociente glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSH) en pacientes con DMAE exudativa comparado con un grupo control. Además analizaremos el efecto del tratamiento anti-VEGF (Pegaptanib (Macugen ®) o Ranibizumab (Lucentis ®)) sobre estos parámetros.

5.3.1. Material y métodos

5.3.1.1. Metodología y muestra poblacional

A 73 pacientes con DMAE exudativa, que nunca habían recibido tratamiento anti-VEGF se les dividió de forma aleatoria en dos grupos:

-37 pacientes recibieron 0,3 mg de Pegaptanib (Macugen ®).

-36 pacientes recibieron 0,5 mg de Ranibizumab (Lucentis ®).

El ranibizumab se administró cada 4 semanas y el pegaptanib cada 6 semanas. El tratamiento se realizó durante 6 meses y se llevo a cabo conforme a las Directrices de práctica clínica de la SERV (Sociedad Española de Retina y Vítreo).

Los análisis de la actividad antioxidante total, las enzimas antioxidantes y los biomarcadores de estrés oxidativo: grupos carbonilo y cociente GSH/GSSH se realizaron antes y después de la terapia anti-VEGF (Tabla 15). Para la realización de este estudio, fue necesario un subgrupo control de 80 individuos sanos (se utilizará el mismo control para la determinación de Hcy plasmática del capítulo 5.4).

Tabla 15. Población de pacientes con DMAE y grupo control del estudio de antioxidantes y biomarcadores de estrés oxidativo.

GRUPO CONTROL	N= 170 (edad media de 71 años, rango 55-78)	
	Mujeres= 82 Hombres= 88	
PACIENTES CON DMAE	N= 163 (edad media de 71 años, 55-82)	
	Mujeres =83 Hombres=80	
PACIENTES CON DMAE TRATADOS	N= 37 (71± 6 años)	
	Tratamiento Pegaptanib	Mujeres=20 Hombres= 17
N= 73 (edad media de 71 años, rango 55-82)	N= 36 (70 ± 4 años)	
	Tratamiento Ranibizumab	Mujeres=20 Hombres=16

5.3.1.2. Toma de muestras

Las muestras de sangre (5 mL) se obtuvieron en ayunas de la vena antecubital de cada paciente, mediante punción intravenosa por personal sanitario autorizado. Se obtuvieron dos muestras de cada paciente, la primera, antes de iniciar la terapia anti-VEGF y la segunda después del tratamiento, que presenta una duración de 6 meses.

Los análisis (Tabla 16) se procesaron en suero o plasma según el parámetro analizado y se realizaron en los laboratorios de la Universidad Católica de Murcia.

Tabla 16. Marcadores analizados

Marcadores del estado antioxidante	Biomarcadores de estrés oxidativo
1. Actividad antioxidante total (μM Trolox) 2. Glutation peroxidasa (U/L) 3. Glutation reductasa (U/L) 4. Superóxido dismutasa (U/Hg)	5. Proteínas oxidadas ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) 6. GSH/GSSH (μM)

5.3.1.3. Parámetros bioquímicos

5.3.1.3.1. Estado antioxidante total.

El Estado Antioxidante Total (TAS) ha sido cuantificado por el método ORAC.

Es el único método que combina en un solo valor el tiempo y velocidad de inhibición del daño oxidativo y proporciona una orientación aproximada de la capacidad antioxidante de los alimentos en el organismo.

Con este ensayo se mide la degradación oxidativa de la fluoresceína al ser atacada por el 2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihidro-clorido (AAPH)²³⁹. Este método se basa en la diferente emisión fluorescente de la β -PE en el proceso de oxidación inducido por el radical AAPH²⁴⁰.

El método ORAC cuantifica la capacidad antioxidante como el área de protección neta en la curva de disminución de fluorescencia en presencia de un antioxidante. Por tanto, surge el concepto de integración al considerar esta área neta reflejando a la vez el tiempo (rapidez) y la extensión (cantidad) en la capacidad antioxidante (disminución de la emisión fluorescente).

La solución stock de fluoresceína (FL) ($4 \mu\text{M}$) se realizó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4 y se conservó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un máximo de cuatro

semanas. La solución de FL se preparó en tampón fosfato sódico mediante una dilución de la disolución stock, a una concentración final de 6 mM.

La concentración de la disolución stock de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox C) utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0.25 mM y se preparó en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4. El suero se diluyó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4. El radical AAPH se preparó diariamente a una concentración 127 mM en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4.

Las medidas de capacidad antioxidante por el método ORAC-FL se llevaron a cabo en un lector de microplacas Synergy HT multi-detec microplatereader de Biotek Instruments, Inc (Winooski, VT, USA), utilizando placas de 96 pocillos de poliestireno con paredes negras y fondo transparente de Nalge Nunc International (Roskilde, Denmark). La fluorescencia de las muestras se leyó por el fondo claro de la placa, usando una longitud de onda de excitación de 485/20 nm, y un filtro de emisión de 528/20 nm. El lector de placas fue controlado por el software KC4, versión 3.4.

La capacidad de absorción del radical se determinó por el método descrito por Dávalos et al.²⁴¹ con ligeras modificaciones²⁴². La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4, en un volumen final de 200 μ L, compuesto por 100 μ L de solución de FL (con una concentración final de 3 nM), 0-70 μ L de bebida antioxidante, 30 μ L de AAPH (con una concentración final de 19 mM) y el resto, hasta completar los 200 μ L, tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4.

La mezcla de reactivos en ausencia del radical AAPH se incubó durante 30 minutos a 37 °C, dispensando inmediatamente después la solución del radical, usando para ello una pipeta multicanal. Seguidamente la microplaca se colocó en el lector y la fluorescencia fue registrada cada segundo y cada 14 segundos durante 2 horas. La microplaca se agitó automáticamente antes de cada lectura. En cada ensayo se realizó un blanco que contenía FL y AAPH con tampón fosfato sódico. Se realizó una recta de calibrado con 8 concentraciones diferentes de Trolox, resultando la ecuación $y = 1.427x + 0.04$ ($r^2 = 0.9959$).

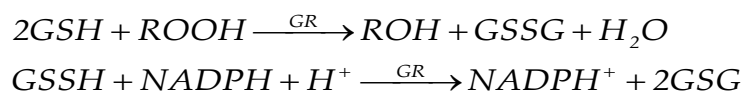
5.3.1.3.2. Cociente GSH/GSSG

El GSH es un tripéptido (γ -Glutamilcisteinilglicina) con un grupo tiol libre. Es un antioxidante que proporciona equivalentes reductores a la enzima GPx, enzima que cataliza la reducción de peróxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno. Durante este proceso el GSH pasa a GSSH, que es reciclado a glutatión reducido por la enzima GR y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Cuando las células son expuestas a estrés oxidativo, la relación GSH/GSSH disminuye como consecuencia de la acumulación de GSSH.

La determinación GSH/GSSH se utiliza como indicador de estrés oxidativo y para monitorizar la efectividad de intervenciones con antioxidantes.

Hemos utilizado el Kit Oxis Research TM. Bioxytech GSH/GSSH-412 TM. El método utiliza el reactivo de Ellman (5-5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico o DTNB), el cual reacciona con GSH para formar un producto detectable espectrofotométricamente a 412 nm. El GSSH puede ser determinado por reducción de GSSH a GSH, el cual es determinado por la reacción con el reactivo de Ellman.

El método de Tietz utiliza el cambio de color desarrollado durante la reacción y la velocidad de reacción es proporcional a las concentraciones de GSH y GSSH.



5.3.1.3.3. Glutatión peroxidasa

La GPx cataliza la oxidación del GSH por el hidroperóxido de cumeno. La GR y NADPH es inmediatamente convertida en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP⁺. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm²⁴³. Para los análisis se utilizó el kit RS 504 (laboratorios Randox).

Se utiliza sangre heparinizada por lo que se recomienda el reactivo de Drabkin para su dilución debido a que la presencia de peroxidasa en la sangre humana puede conducir a falsos resultados (más elevados). La adición de cianuro

sirve para inhibir esta interferencia positiva.

La concentración de GPx se calcula a partir de la siguiente fórmula:

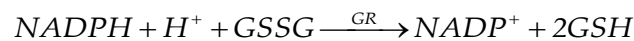
$$\frac{U}{L} \text{ de hemolisado} = 8412 * \Delta A \text{ 340} \frac{nm}{min}$$

Los resultados se expresan finalmente en U/g Hb (unidades enzimáticas/g de hemoglobina) calculados a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de la muestra} = \frac{\text{Unidades GPx}}{100m} \div g \text{ Hb} // dL$$

5.3.1.3.4. Glutación reductasa

La GR cataliza la reducción del GSSH en presencia de NADPH, el cual es oxidado a NADP⁺. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm. Para los análisis se utilizó el kit GR 2368 suministrado por laboratorios Randox²⁴⁴.



Se centrifuga 0.5 mL de sangre total durante 5 minutos a 2000 r.p.m. y se elimina el plasma lavando tres veces (resuspendiendo en una solución de NaCl al 0.9% y centrifugando 5 minutos a 2000 r.p.m. cada vez). A continuación se lisan las células resuspendiéndolas en 0.5 ml de agua bidestilada fría, se dejan 10 minutos entre 2 y 8 °C y se centrifuga el lisado durante 5 minutos a 2000 r.p.m. Finalmente se diluyen 100 µL de lisado con 1.9 mL de NaCl al 0.9% y se analiza.

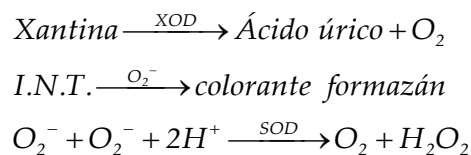
Para el cálculo de resultados debemos conocer los valores de hemoglobina del individuo. La concentración de GR se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{u}{L} = 4983 \times \Delta A \text{ 340} \frac{nm}{min}$$

5.3.1.3.5. Superóxido dismutasa

La función de la SOD es acelerar la dismutación de un radical tóxico, el radical superóxido (O_2^-), producido durante un proceso oxidativo enérgico, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular²⁴⁵. Para los análisis se utilizó el kit SD 125 suministrado por laboratorios Randox.

Este método emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(yodofenil)-3(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa espectrofotométricamente por el grado de inhibición de esta reacción.



Se utilizan muestras de sangre entera heparinizada o con EDTA. Para ello se centrifugan 0.5 mL de sangre entera durante 10 minutos a 3000 r.p.m. y después se lavan los eritrocitos cuatro veces (con solución Na Cl al 0.9% centrifugando después de cada lavado). El lavado de eritrocitos se completa con agua bidestilada fría, se mezcla y se deja reposar durante 14 minutos a 4 °C. Finalmente el lisado se diluye con Tampón Fosfato pH 7.0.

La concentración de SOD se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \text{ de patrón o de muestra}$$

Todos los índices tanto de los patrones como de las muestras diluidas deben ser convertidos en porcentajes del índice del blanco y sustraídos del 100% para obtener un porcentaje de inhibición:

$$\frac{100 - (\Delta A \text{ muestra} / \text{min} * 100)}{\Delta ASL / \text{min}} = \% \text{inhibición}$$

Se utiliza el porcentaje de inhibición de la muestra para obtener las unidades de SOD de la curva patrón según:

$$\begin{aligned} \text{UU de SOD/mL de sangre entera} &= \\ &= \text{UU de SOD en la curva patrón/mL} \times \text{factor de dilución} \end{aligned}$$

Los resultados finales se expresan en U/g Hb conseguidos a través de la siguiente fórmula, una vez conocidos los gramos de hemoglobina del individuo.

$$\frac{\text{Unidades SOD/mL}}{\text{g Hb/mL}} = \text{Unidades de SOD/g de hemoglobina}$$

5.3.1.3.6. Grupos carbonilo. Marcadores de oxidación proteica

Se analiza mediante un ensayo ELISA en muestras de suero sanguíneo. Para el análisis se ha utilizado el kit PCKIT P081 suministrado por BioCell Corporation Limited.

La concentración de grupos carbonilo en una muestra proteica se determina por derivatización con dinitrofenilhidracina (DNP). El método ELISA permite medir cuantitativamente grupos carbonilo en cantidades de microgramos de proteína. El principio del ensayo es el siguiente: las proteínas de la muestra reaccionan con el DNP, quedando el DNP-proteína ligada a la placa ELISA. El DNP no conjugado y los constituyentes no proteicos son eliminados mediante un lavado. A continuación la DNP-proteína absorbida reacciona con el anti-DNP-biotín anticuerpo y se une la estreptavidina HRP a este complejo. Posteriormente se añade el agente cromático que contiene peróxido, el cual cataliza la oxidación produciendo color. Para finalizar se mide la absorbancia a 450 nm²⁴⁶.

5.3.1.4. Los efectos adversos

Durante los 6 meses de duración del estudio no se registró ningún efecto adverso ocular o sistémico en la muestra poblacional.

5.3.2. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre el TAS en pacientes con DMAE exudativa

Se observa que los pacientes con DMAE exudativa presentan unos valores medios de actividad antioxidante total menores que los observados en el grupo control ($166,6 \pm 20,4$ versus $184,5 \pm 23,5$ $\mu\text{MTrolox}$ respectivamente), observándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Estos resultados coinciden con los observados por Shen et al.²⁵⁷ y sugieren que las alteraciones en la homeostasis de los procesos de óxido-reducción están relacionadas con la patología de la DMAE.

En la siguiente tabla (Tabla 17) se muestran los valores medios de la actividad antioxidante inicial en el grupo control y en los enfermos de DMAE que son tratados con la terapia anti-VEGF (Pegaptanib o Ranibizumab) y el efecto del tratamiento sobre estos valores.

Cuando comparamos la actividad media antioxidante iniciales de los pacientes con DMAE exudativa y el grupo control observamos una disminución de dicha actividad. Además, cuando se compara la actividad antioxidante media inicial de los dos grupo de estudio, se observa que los pacientes tratados con ranibizumab tienen mayor actividad antioxidante ($202,4 \pm 27,4$ $\mu\text{MTrolox}$) que los pacientes tratados con pegaptanib ($166,6 \pm 20,4$ $\mu\text{MTrolox}$), observándose diferencias significativas. En ambos grupos tras la administración del tratamiento anti-VEGF se observa una disminución de la actividad antioxidante, sin observarse diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

Tabla 17. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre TAS de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.

	CONTROL	Pegaptanib		Ranibizumab	
		Inicio	Final	Inicio	Final
TAS (μ MTrolox)	197,5 \pm 17,3	166,6 \pm 20,4*	151,2 \pm 16,5	202,4 \pm 27,4*	193,7 \pm 122,1

TAS: actividad antioxidante total. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. * $p \leq 0.05$ diferencias significativas entre los valores iniciales respecto a los dos grupos DMAE

5.3.3. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre el cociente GSH/GSSH en pacientes con DMAE exudativa

Los valores medios del cociente GSH/GSSH observados en pacientes con DMAE exudativa son inferiores a los observados en un grupo control (7,2 \pm 1,4 μ M versus 7,5 μ M respectivamente), no observándose diferencias significativas. Estos resultados coinciden con los resultados observados por Julius et al²⁴⁷ y Samiec et al²⁴⁸ que muestran que pacientes con enfermedades crónicas presentaban niveles de glutatión reducido más bajos que los individuos sanos. Por tanto, los niveles bajos de GSH producen a nivel celular un mayor riesgo de daño oxidativo. Sin embargo, Cai et al²⁴⁹ observaron que el estado redox del sistema glutatión no variaba significativamente en pacientes con DMAE. Otros autores^{250,251} observaron niveles superiores de glutatión oxidado en pacientes con DMAE.

Cuando se comparan los valores medios iniciales del cociente GSH/GSSH en los dos grupos de estudio se observa que los pacientes tratados con pegaptanib tienen valores superiores que los pacientes tratados con ranibizumab, observándose diferencias significativas (8,2 \pm 1,4 μ M versus 6,2 \pm 1,1 μ M) (tabla 18).

Tras la terapia anti-VEGF en todos los pacientes se observa una ligera disminución del cociente GSH/GSSH, si bien no se observan diferencias significativas ($p \geq 0,05$) (Tabla 18).

Tabla 18. Efecto del tratamiento anti-VEGF (Pegaptanib o Ranibizumab) sobre el cociente GSH/GSSH de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.

	CONTROL	Pegaptanib		Ranibizumab	
		Inicio	Final	Inicio	Final
GSH/GSSH H (μM)	8,5 \pm 2	8,2 \pm 1,4	7,9 \pm 1,6	6,2 \pm 1,1	5,8 \pm 2,1

GSH/GSSH: glutatión reducido/oxidado. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

5.3.4. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en pacientes con DMAE exudativa

Cuando se comparan los valores medios de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en pacientes con DMAE con los observados en un grupo control, se muestran valores superiores en el grupo control si bien no se observan diferencias significativas (7387,4 \pm 037 U/L *versus* 7913,6 \pm 265 U/L). Estos resultados coinciden con los observados por otros autores^{252,253} y están en desacuerdo con los resultados observados por Cohen et al.²⁵⁴ que observaron actividades similares en ambos grupos y Yildirim et al⁴⁰.

Venza et al.²⁵⁵ y Evereklioglu et al.¹³⁹ demostraron que la actividad de la enzima GPx es inferior en el plasma y eritrocitos de pacientes con DMAE que en un grupo control.

Nuestros resultados coinciden con la mayoría de los resultados publicados, es decir, menor actividad de la enzima GPx en pacientes diagnosticados con DMAE respecto al grupo control. Inicialmente el valor medio

de la actividad de la enzima GPx es menor en los pacientes tratados con pegaptanib que en los pacientes tratados con fue ranibizumab, sin embargo no se observan diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Tras la administración de la terapia anti-VEGF se produjo una disminución de estos valores, si bien no se observan diferencias significativas.

En la siguiente tabla (tabla 19) se observan los valores medios iniciales de la actividad de la enzima GPx antes y después de la terapia anti-VEGF y los valores del grupo control.

Tabla 19. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre GPx de pacientes con DMAE exudativa y grupo control

	CONTROL	Pegaptanib		Ranibizumab	
		Inicio	Final	Inicio	Final
GPx(U/L)	7450±1501	7149,1±2120	6549,1±1511	7328,1±1954	6728±1846

GPx: glutatión peroxidasa. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

5.3.5. Efecto de la terapia anti-VEGF en la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) en pacientes con DMAE exudativa

Cuando se comparan los valores medios de la actividad de la enzima glutatión reductasa en pacientes con DMAE con los observados en un grupo control, se muestran valores superiores en el grupo control, observándose diferencias significativas ($54,1 \pm 3,4$ U/L *versus* $59,3 \pm 4,7$ U/L). Estos resultados coinciden con los observados por otros autores^{254,255}. Venza et al.²⁵⁵ y Evereklioglu et al.¹³⁹ observaron que la actividad de la enzima GR es inferior en el plasma y eritrocitos de pacientes con DMAE que en un grupo control.

Inicialmente el valor medio de la actividad de la enzima GR es menor en los pacientes tratados con ranibizumab que en los pacientes tratados con

pegaptanib, observándose diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Tras la administración de la terapia anti-VEGF se produjo una disminución de estos valores, si bien no se observan diferencias significativas (Tabla 20).

Tabla 20. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre GR de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.

	CONTROL	Pegaptanib		Ranibizumab	
		Inicio	Final	Inicio	Final
GR (U/L)	57±3.5	54.1±3.4*	52.6±2.4	50.6±2.9*	48.7±2.7

GR: glutatión reductasa. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. * $p \leq 0,05$ diferencias significativas entre los valores iniciales respecto a los dos grupos DMAE

5.3.6. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en pacientes con DMAE exudativa

Los valores medios observados en pacientes con DMAE exudativa son inferiores a los observados en un grupo control (825,8±25,4 Ug/Hb *versus* 947,8±27,2 Ug/Hb, respectivamente), observándose diferencias significativas entre ambos grupos analizados. Estos resultados coinciden con los resultados observados por Evereklioglu et al¹³⁹, Popovici et al²⁵² y Venza et al.²⁵⁵ que muestran que pacientes con DMAE presentan niveles inferiores de la actividad de la enzima SOD. Sin embargo, Cohen et al²⁵⁴ muestran unos resultados similares en el grupo control que en los pacientes con DMAE.

Inicialmente el valor medio de la actividad de la enzima SOD es menor en los pacientes tratados con ranibizumab que en los pacientes tratados con fue pegaptanib, no observándose diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Tras la administración de la terapia anti-VEGF se produjo una disminución de estos valores, si bien no se observan diferencias significativas (Tabla 21).

Tabla 21. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre SOD de pacientes con DMAE exudativa.

	CONTROL	Pegaptanib		Ranibizumab	
		Inicio	Final	Inicio	Final
SOD (Ug/Hb)	890.8±55.8	885.8±25.4	845.8±22.1	815.8±75.8	795.8±75.8

SOD: superóxido dismutasa. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

5.3.7. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la concentración de grupos carbonilo (marcadores de la oxidación proteica) en pacientes con DMAE exudativa

Cuando se comparan los valores medios de la concentración de grupos carbonilo en pacientes con DMAE con los observados en un grupo control, se muestran valores superiores en pacientes con DMAE observándose diferencias significativas (70,1±6,0 $\mu\text{mol/mg}$ *versus* 60.3 ±4.1 $\mu\text{mol/mg}$). Estos resultados coinciden con los observados por Venza et al²⁵⁵ que observaron que la edad disminuye el estado antioxidante y aumenta el estado oxidante y por tanto, aumenta los grupos carbonilos en los pacientes con DMAE. Serap et al²⁵⁶ observaron también un aumento de los grupos carbonilos en pacientes con DMAE respecto al grupo control.

Inicialmente se observa que el valor medio en la concentración de grupos carbonilo es superior en los pacientes tratados con Pegaptanib que en los pacientes tratados con Ranibizumab, observándose diferencias significativas.

Tras la terapia anti-VEGF, tanto en los pacientes tratados con Pegaptanib como en los tratados con Ranibizumab se observó un aumento del valor medio de grupo carbonilos, no observándose diferencias significativas (Tabla 22).

Tabla 22. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre grupos carbonilos de pacientes con DMAE exudativa y el grupo control.

	CONTROL	Pegaptanib		Ranibizumab	
		Inicio	Final	Inicio	Final
Grupos carbonilo (μmol/mg)	65±3,1	72,1±7,0*	75,1±8,1	68,3 ±4,1*	71.8±5,8

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. *p≤ 0.05 diferencias significativas entre los valores iniciales respecto a los dos grupos DMAE

**5.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTI-VEGF
SOBRE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y EN
HUMOR VÍTREO**

5.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTI-VEGF SOBRE LOS NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA Y EN HUMOR VÍTREO

Los niveles elevados de homocisteína (hcy) plasmáticos son tóxicos para el endotelio vascular por: favorecer la liberación de radicales libres, producir un entorno de hipercoagulabilidad y cambios estructurales en las proteínas por la homocisteína-tiolactato. Además la Hcy combinada con LDL se agrega a macrófagos en el vaso promoviendo su oxidación y causando la modificación el endotelio vascular (Figura 6). (En el apartado 3.6.2. se indican todos los mecanismos fisiológicos de la Hcy en el RCV).

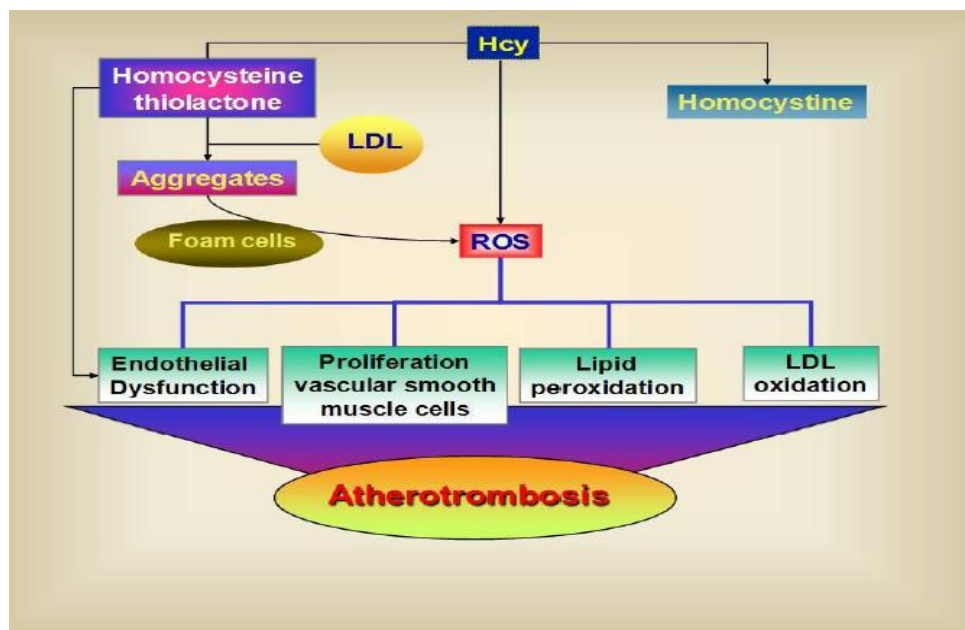


Figura 6. Intervención de la homocisteína en el proceso aterotrombótico.²⁵⁷

La Hcy produce varios efectos tóxicos a nivel celular, tales como la estimulación de los receptores del N-metil-D-aspartato (NMDA)²⁵⁸. La toxicidad de la Hcy sobre la capa de células ganglionares de la retina como consecuencia de esta estimulación, provoca apoptosis en la retina y causa daños en las células

ganglionares. Viktorov et al²⁵⁹ observaron *in vitro* que concentraciones elevadas de Hcy en tejidos de la retina de ratas producen alteraciones en la capa nuclear interna y externa, y en la capa de células ganglionares. La elevación crónica de los niveles de Hcy en animales causa un incremento de los marcadores de inflamación²⁶⁰.

La Hcy es un aminoácido precursor del sulfuro de hidrógeno (H₂S), que se forma mediante una reacción de transulfuración catalizada por las enzimas cistationina β-sintasa y cistationina γ-liasa. El H₂S ha surgido recientemente como un nuevo mediador en la homeostasis cardiovascular; actúa como un potente vasodilatador y desempeña varias funciones que incluyen la regulación del diámetro de los vasos, la protección al endotelio del estrés redox, mejora las lesiones por isquemia-reperfusión y la inflamación crónica. Sin embargo, no está claro el mecanismo responsable de estos efectos beneficiosos. La hHcy disminuye la producción de H₂S (agente de protección vascular incluso a bajas concentraciones)²⁶¹.

Son varios los estudios que relacionan de forma significativa los niveles plasmáticos elevados de Hcy y el riesgo de DMAE^{39,47,137,138,147-149,151}. Además, como se ha comentado en el apartado 5.1 la hHcy parece estar claramente asociada con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y cerebrovascular.

La Hcy tiene un efecto estimulante sobre la expresión de los VEGF en las células gliales de la retina, por tanto es un factor angiogénico potente que agravaría la neovascularización producida en la DMAE. Roybal y cols.²⁶² observaron que la Hcy aumenta la expresión de los VEGF en el RPE. Lee y col.²⁶³ observaron que la hHcy aumenta los niveles de VEGF en la retina de ratas.

Los VEGF ejercen un efecto protector a nivel sistémico ya que intervienen en la supervivencia de las células endoteliales, en la prevención de la apoptosis y en la inducción de la expresión de proteínas antiapoptosis. Además, presentan efectos mitogénicos sobre diferentes células, tales como las células del EPR y mejoran la permeabilidad vascular mediante la producción de NO. Los VEGF intervienen en la regulación de la presión arterial induciendo la vasodilatación.

El objetivo de este capítulo es analizar el efecto de la terapia anti-VEGF en los niveles de homocisteína en vítreo y en plasma. Este estudio nos permitirá conocer si el tratamiento con la terapia anti-VEGF aumenta el riesgo cardiovascular.

5.4.1. Metodología de análisis de la homocisteína en pacientes con DMAE exudativa

5.4.1.1. Metodología y muestra poblacional

A 73 pacientes con DMAE exudativa, que nunca habían recibido tratamiento anti-VEGF se les dividió de forma aleatoria en dos grupos:

-37 pacientes recibieron 0,3 mg de Pegaptanib (Macugen®).

-36 pacientes recibieron 0,5 mg de Ranibizumab (Lucentis®).

El ranibizumab se administró cada 4 semanas y el pegaptanib de sodio cada 6 semanas. El tratamiento se realizó durante 6 meses y se llevo a cabo conforme a las Directrices de práctica clínica de la SERV (Sociedad Española de Retina y Vítreo).

Los análisis de Hcy en plasma y en vítreo se realizaron antes y después de la terapia anti-VEGF. Para la realización de este estudio, fueron necesarios dos grupos control. Un grupo control, constituido por pacientes con membrana epirretiniana idiopática, como grupo control del análisis de la homocisteína en vítreo y un grupo control de 80 individuos sanos, para el análisis de la homocisteína plasmática (Tabla 23).

Tabla 23. Población de pacientes con DMAE y grupo control del estudio de homocisteína plasmática e invítreo.

GRUPOS CONTROL-LES	GRUPO CONTROL de homocisteína plasmática		GRUPO CONTROL de homocisteína en vítreo	
		N= 80 (75 ± 2 años)		N=40 (76 ± 4 años)
	Mujeres= 40	Hombres= 40	Mujeres= 20	Hombres=20
PACIENTES CON DMAE (N= 73) (71 años, rango 55-82)	Tratamiento Pegaptanib		N= 37 (71± 6 años)	
		Mujeres=20	Hombres= 17	
	Tratamiento Ranibizumab		N= 36 (70 ± 4 años)	
		Mujeres=20	Hombres=16	

5.4.1.2. Toma de muestras

Las muestras de sangre (5 mL) se obtuvieron en ayunas de la vena antecubital de cada paciente, mediante punción intravenosa por personal sanitario autorizado. Se obtuvieron dos muestras de cada paciente, la primera, antes de iniciar la terapia anti-VEGF y la segunda después del tratamiento, que presenta una duración de 6 meses.

La extracción del humor vítreo (0,3 mL) se realizó mediante aspiración con una jeringa de 1 ml, antes y después del tratamiento anti-VEGF en quirófano.

Los análisis para la determinación de los niveles de Hcy plasmática se realizaron en los laboratorios del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

Los análisis de Hcy en vítreo se realizaron en los laboratorios del servicio de análisis clínicos del Hospital Quirón de Murcia.

5.4.1.3. *Parámetros bioquímicos*

5.4.1.3.1. Determinación de Homocisteína plasmática y en humor vítreo

La mayor parte de la Hcy plasmática se encuentra unida a albúmina, en forma de homocisteína-disulfido, o en forma mixta de disulfido con cisteína. Por tanto antes de llevar a cabo la determinación de Hcy es necesario generar Hcy libre por reducción.

Los niveles de Hcy se midieron en un analizador BN ProSpec® (de acuerdo con el protocolo suministrado en el kit de Siemens N Latex HCY OPAX 03).

La Hcy y las formas de Hcy presentes en la muestra se reducen y forman Hcy libre utilizando el ditioneitol (DTT). La Hcy libre se convierte en SAH (S-adenosil-L- Hcy) utilizando la SAH hidrolasa y exceso de adenosina. Por último, se produce la fase de inmuno-precipitación, con formación de inmunocomplejos solubles, cuya concentración es directamente proporcional a la concentración de Hcy en la muestra¹⁶⁴.

5.4.1.4. *Efectos adversos*

Durante los 6 meses de duración del estudio no se registró ningún efecto adverso ocular o sistémico en la muestra poblacional.

5.4.2. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la homocisteína plasmática en pacientes con DMAE exudativa

Cuando comparamos los valores medios de Hcy plasmática de los pacientes con DMAE (en el grupo de pegaptanib $13.0 \pm 4.2 \mu\text{mol/L}$ y en el de ranibizumab $12.8 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$) se observan valores superiores que los observados en el grupo control ($10.78 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$) ($p= 0,03$).

Inicialmente, no se observan diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en los niveles de Hcy plasmática, entre los pacientes que son tratados con Pegaptanib y los pacientes tratados con Ranibizumab ($13.0 \pm 4.2 \mu\text{mol/L}$ y $12.8 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$

respectivamente). Tras el tratamiento anti-VEGF no se observan diferencias significativas en los valores de Hcy plasmática (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre los niveles de Hcy plasmática en pacientes con DMAE exudativa y grupo control.

Parámetro	Pegaptanib		Ranibizumab		CONTROL
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	$13.0 \pm 4.2^*$	13.8 ± 3.5	$12.8 \pm 2.5^*$	11.1 ± 1.5	$10.78 \pm 0.6^*$

Hcy: homocisteína. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. * $p \leq 0.05$ diferencias significativas entre el grupo control y DMAE.

5.4.3. Efecto de la terapia anti-VEGF sobre la homocisteína en humor vítreo en pacientes con DMAE exudativa

Cuando comparamos los niveles de Hcy en vítreo de pacientes con DMAE exudativa con los observados en un grupo control, se observa que los pacientes con DMAE presentan niveles superiores ($p = 0,02$).

Inicialmente, antes de comenzar el tratamiento anti-VEGF (Pegaptanib o Ranibizumab), se observa que los pacientes que reciben el tratamiento con Ranibizumab presentan valores de Hcy en vítreo superiores que los pacientes que reciben el tratamiento con Pegaptanib ($p = 0,04$) (Tabla 24).

Tras la administración de la terapia anti-VEGF, no se observan cambios significativos ($p \geq 0,05$) (Tabla 25).

No se observa correlación entre los niveles de Hcy en vítreo y los niveles de Hcy plasmática.

Tabla 25. Resultados de Pegaptanib o Ranibizumab antes y después de la administración sobre la Hcy en humor vítreo de pacientes con DMAE exudativa y grupo control.

Parámetro	Pegaptanib		Ranibizumab		CONTROL
	Inicio	Final	Inicio	Final	
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	$1.00 \pm 0.3^{**}$	0.9 ± 0.4	$1.4 \pm 0.6^{**}$	1.2 ± 0.4	$0,19 \pm 0.1^*$

Hcy: homocisteína. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. * $p \leq 0.05$ diferencias significativas entre el grupo control y DMAE. ** $p \leq 0.05$ diferencias significativas entre los valores iniciales respecto a los dos grupos DMAE.

Considerando los niveles de Hcy plasmática como marcador de riesgo cardiovascular, observamos que el tratamiento anti-VEGF no aumenta el riesgo cardiovascular.

Los fármacos anti-VEGF deben administrarse con precaución y el uso intravítreo a largo plazo de anti-VEGF puede tener efectos colaterales en las células de la retina, aunque estos resultados sólo se han confirmado en modelos animales^{263,264}. El uso de anti-VEGF no es tan optimista como lo era hace varios años. Además, el fármaco que se dirige al proceso angiogénico para bloquearlo puede provocar la estimulación y aceleración del desarrollo de enfoques alternativos antiangiogénicos. La inhibición de la vía del VEGF puede perturbar el mantenimiento homeostático de la vascularización normal y dar lugar a retraso en la cicatrización de las heridas, hipertensión, proteinuria, trombosis y hemorragias^{236,265}.

A nivel de práctica clínica, no se ha observado un incremento de los efectos secundarios tromboembólicos inducidos por la terapia anti-VEGF, pero se recomienda la monitorización de los factores de riesgo cardiovascular de los pacientes con DMAE exudativa en tratamiento continuado.

La mayoría de los estudios publicados^{39,137,138,147,149, 187, 266} coinciden con la relación de a mayores niveles plasmáticos de Hcy mayor riesgo de DMAE

exudativa (sobre la DMAE atrófica no hay relación); sin embargo, no hay un valor fijo de valor de Hcy¹³⁸.

Solamente hemos encontrado dos estudios en los que se determinan las concentraciones de Hcy en humor vítreo aunque en patologías oculares diferentes a la DMAE^{267,268}. Coral y cols.²⁶⁷ analizaron los niveles de Hcy vítrea en pacientes con retinopatía diabética proliferativa y en pacientes con desprendimiento de retina regmatógeno, observando niveles superiores en ambas patologías oculares respecto al grupo control. Aunque las etiologías son diferentes, el aumento de los niveles de Hcy en pacientes con retinopatía diabética proliferativa podría ser debido a una alteración en la permeabilidad de la barrera retiniana, mientras que en los pacientes con desprendimiento de retina regmatógeno podría ser debido a la desintegración de la barrera retiniana externa. La pérdida de permeabilidad de la barrera hemato-retiniana o su degradación (exterior e interior) puede aumentar la difusión de Hcy al humor vítreo.

Varios autores²⁶⁸ en pacientes con retinopatía diabética proliferativa, observaron niveles elevados de homocisteína en vítreo superiores a los observados en un grupo control. Además observaron una relación entre los niveles de Hcy plasmática, vítrea y acuosa en los pacientes con retinopatía diabética proliferativa.

Nuestros resultados coinciden con los resultados observados en los estudios anteriores, ya que los pacientes con DMAE exudativa presentan niveles superiores de Hcy vítrea y plasmática que el grupo control.

6. CONCLUSIONES

1

CONCLUSIONES

1. A pesar de que no encontramos diferencias en el perfil lipídico de los pacientes con DMAE respecto al grupo control, si las hemos encontrado en los marcadores de inflamación analizados, que también son predictivos de riesgo cardiovascular como la PCR, el fibrinógeno y la homocisteína plasmática. A este respecto serían necesarios estudios posteriores que confirmaran esta asociación, puesto que los resultados encontrados en la literatura son controvertidos.
2. Transcurridos 6 meses de la inyección intravítrea de los dos tratamientos anti VEGF administrados a los pacientes con DMAE, no encontramos cambios en el perfil lipídico o en los marcadores de riesgo cardiovascular analizados, respecto al inicio del tratamiento. Por esto podemos concluir que el tratamiento con los dos anti VEGF utilizados en el estudio no modifica el riesgo cardiovascular del paciente con DMAE
3. Los pacientes con degeneración macular asociada a la edad presentan valores inferiores de actividad antioxidante total y de enzimas antioxidantes como la enzima superóxido dismutasa y glutatión reductasa, observándose diferencias significativas.
4. Los niveles medios del cociente glutatión reducido/glutatión oxidado es inferior en los pacientes con DMAE exudativa que en el grupo control, si bien no se observan diferencias significativas. Los valores medios de grupos carbonilo (marcador de oxidación proteica) son superiores en los pacientes con DMAE que en el grupo control.
5. Se observa que los pacientes con DMAE exudativa presentan mayor estrés oxidativo que un grupo control, por tanto el consumo de antioxidantes podría prevenir esta enfermedad y/o enlentecer su progresión.
6. Tras la terapia anti-VEGF (Pegaptanib o Ranibizumab), no se observan cambios significativos en la actividad antioxidante total, las enzimas

antioxidantes, el cociente glutatión reducido/glutatión oxidado ni en los grupos carbonilo, marcadores de la oxidación proteica.

7. Los pacientes con DMAE exudativa presentan niveles medios superiores de homocisteína plasmática y en vítreo que un grupo control.
8. Tras la administración de la terapia anti-VEGF ((Pegaptanib o Ranibizumab), no se observan cambios significativos en los valores medios de homocisteína plasmática y en vítreo. No se observa correlación entre los niveles de Homocisteína en vítreo y los niveles de Hcy plasmática.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Archives of Ophthalmology* 2004; 122(4):564-572.
2. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012; 379(9827):1728-1738.
3. Stewart, MW. Clinical and differential utility of VEGF inhibitors in wet age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 2012; 6:1175-86.
4. National Advisory Eye Council. Report of the retinal diseases panel: vision reseach: a national plan, (1994-1998). Bethesda, MD: United States Department of Health and Human Services, Publication NIH 1993; 93-3186.
5. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992; 99: 933-43.
6. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, et al. Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(4):564-572.
7. Brown GC, Brown MM, Sharma S, et al. The burden of age-related macular degeneration: a value medicine analysis. *Trans Am Ophthalmol. Soc* 2005; 103:173-178.
8. Nowark JZ. Age related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep* 2006; 58:353-363.
9. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis *BMC Ophthalmol* 2010; 10:31.
10. Spanish Eyes Epidemiological (SEE) Study Group. Prevalence of age-related macular degeneration in Spain. *Br J Ophthalmol* 2011; 95(7):931-6.
11. Myers CE, Klein BE, Gangnon R, et al. Cigarette Smoking and the Natural History of Age-related Macular Degeneration: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2014.

12. Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, et al. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology* 2004; 111:1280–7.
13. Seddon JM, Francis PJ, George S, et al. Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *JAMA* 2007; 297:1793–800.
14. Kuo JZ, Wong TY, Ong FS. Genetic risk, ethnic variations and pharmacogenetic biomarkers in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Expert Rev Ophthalmol* 2013; 8(2): 127–140.
15. Boïko ÉV, Churashov SV, Kamilova TA. Molecular genetic basis of age-related macular degeneration. *Vestn Oftalmol* 2013; 129(2):86-90.
16. Schmidt S, Saunders AM, De la Paz MA, Postel EA, Heinis RM, Agarwal A et al. Association of the apolipoprotein E gene with age-related macular degeneration: possible effect modification by family history, age, and gender. *Mol Vis.* 2000; 6: 287-93.
17. Itty S, Day S, Lyles KW, et al. Vitamin D deficiency in neovascular versus non neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2014.
18. Marco A. Zarbin. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2004; 122: 598-614.
19. De La Paz M, Anderson RE. Region and age-dependent variation in susceptibility of the human retina to lipid peroxidation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:3497-3499.
20. Wu YL, Li J, Yao K. Structures and biogenetic analysis of lipofuscin bis-retinoids. *J Zhejiang Univ Sci B* 2013; 14(9):763-73.
21. Kaarniranta K, Sinha D, Blasiak J, et al. Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy.* 2013; 9(7): 973–984.
22. Finnemann SC, Leung LW, Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:3842-3847.

23. Höhn A, Jung T, Grimm S, et al. Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. *Free Radic Biol Med* 2010; 48:1100-8.
24. Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012; 33(4):399-417.
25. Zigler JS, Zhang C, Grebe R, et al. Mutation in the β A3/A1-crystallin gene impairs phagosome degradation in the retinal pigmented epithelium of the rat. *J Cell Sci* 2011; 124:523-31.
26. Sreekumar PG, Spee C, Ryan SJ, et al. Mechanism of RPE Cell Death in Crystallin Deficient Mice: A Novel and Critical Role for MRP1-Mediated GSH Efflux. *PLoS One* 2012; 3:e33420.
27. Chen C, Cano M, Wang JJ, et al. Role of UPR dysregulation in oxidative injury of retinal pigment epithelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2013.
28. Smith MI, Deshmukh M. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis requires bax for commitment and Apaf-1 for execution in primary neurons. *Cell Death Differ* 2007; 14:1011–1019.
29. Song D, Dunaief JL. Retinal iron homeostasis in health and disease. *Front Aging Neurosci* 2013.
30. Hadziahmetovic M, Song Y, Wolkow N, et al. Bpm6 regulates retinal iron homeostasis and has altered expression in age-related macular degeneration. *Am.J.Pathol* 2011; 179:335–348.
31. Kozhevnikova OS, Korbolina EE, Ershov NI, et al. Rat retinal transcriptome: Effects of aging and AMD-like retinopathy. *Cell Cycle*. 2013; 12(11): 1745–1761.
32. Kalariya NM, Ramana KV, Srivastava SK, et al. Genotoxic effects of carotenoid breakdown products in human retinal pigment epithelial cells. *Curr. Eye Res* 2009; 3:737–747.
33. Delaney S, Jarem DA, Volle CB, et al. Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. *Free Radic. Res* 2012; 46:420–441.
34. Lau LI, Liu CJ, Wei YH. Increase of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in aqueous humor of patients with exudative age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(11):5486-90.

35. Maté I, Cruces J, Giménez-Llort L, et al. Function and Redox State of Peritoneal Leukocytes as Preclinical and Prodromic Markers in a Longitudinal Study of Triple-Transgenic Mice for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2014.
36. Blasiak J, Glowacki S, Kauppinen A, et al. Mitochondrial and Nuclear DNA Damage and Repair in Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci* 2013; 14:2996-3010.
37. Gallego-Pinazo R, Zanón-Moreno V, Sanz S, et al. The tumour inhibitor p53 gene has the ability of triggering proliferation arrest and cellular death by apoptosis subsequent to several factors, among them oxidative stress. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2008; 83(2):105-111.
38. Sachdeva MM, Cano M, Handa JT. Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp Eye Res* 2013; 4835(13):00313-8.
39. Orhan A, Sedat A, Hakan A, et al. Decreased serum paraoxonase 1 activity and increased serum homocysteine and malondialdehyde levels in age-related macular degeneration. *Tohoku J. Exp. Med* 2009; 217:17-22.
40. Yildirim Z, Ucgun NI, Yildirim F. The role of oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Clinics* 2011; 66.
41. Stress Oxidative and Age Related Macular Degeneration. "Induced Oxidative Stress: Role in Diseases and Biological Effects". Nova Science Publishers. Abril 2014
42. Draper HH, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 1990; 20: 901-907.
43. Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *J Exp Bot* 2008; 59(14):3781-3801.
44. Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history tradeoffs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett* 2009; 12: 75-92.
45. Alvarez E, Ruiz Gutierrez V, Santa-maría C, et al. Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat

peritoneal macrophage membranes. *Mech Ageing Dev* 1993; 71(1-2):1-12.

46. Jia L, Dong Y, Yang H, et al. Serum superoxide dismutase and malondialdehyde levels in a group of Chinese patients with age-related macular degeneration. *Aging Clin Exp Res* 2011; 23(4):264-7.

47. Javadzadeh A, Ghorbanihaghjo A, Bahreini E, et al. Serum paraoxonase phenotype distribution in exudative age-related macular degeneration and its relationship to homocysteine and oxidized low-density lipoprotein. *Retina* 2012; 32(4):658-66.

48. Burcham PC, Kuham YT. Introductions of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product; malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1996; 220: 996-1001.

49. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxi Redox Signal* 2008; 10(8):1343-1374.

50. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1417.

51. Druesne-Pecollo N, Latino-Martel P, Norat T, et al. Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Int J Cancer* 2010; 127:172.

52. Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 309:2005.

53. Li Z, Dong X, Liu H, et al. Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Mol Vis* 2013; 19:1656-1666.

54. Wisniewska A, Subczynski WK. Distribution of macular xanthophylls between domains in a model of photoreceptor outer segment membranes. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(8):1257-1265.

55. Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA* 1994; 272(18): 1413-1420.

56. Delcourt C, Carriere I, Delage M, et al. Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: the POLA Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47 (6): 2329-2335.
57. Neelam K, Hogg RE, Stevenson MR, et al. Carotenoids and co-antioxidants in age-related maculopathy: design and methods. *Ophthalmic Epidemiol* 2008; 15(6):389-401.
58. Dong X, Li Z, Wang W, et al. Protective effect of canolol from oxidative stress-induced cell damage in ARPE-19 cells via an ERK mediated antioxidative pathway. *Mol Vis*. 2011; 17:2040-8.
59. Rastmanesh R. Potential of melatonin to treat or prevent age-related macular degeneration through stimulation of telomerase activity. *Med Hypotheses* 2011; 76(1):79-85.
60. Rosen RB, Hu DN, Chen M, et al. Effects of melatonin and its receptor antagonist on retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide damage. *Mol Vis* 2012; 18:1640-8.
61. Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *Arch Ophthalmol* 1993; 111(1): 104-109. Erratum in: *Arch Ophthalmol* 1993; 111 (11): 1499. *Arch Ophthalmol* 1993; 111 (9): 1228. *Arch Ophthalmol* 1993; 111 (10): 1366.
62. West S, Vitale S, Hallfrisch J, et al. Are antioxidants or supplements protective for age-related macular degeneration? *Arch Ophthalmol* 1994; 112(2):222-227.
63. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS Report No. 8. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(10):1417-1436. Erratum in: 2008; 126(9):1251.
64. Clemons TE, Kurinij N, Sperduto RD. Associations of mortality with ocular disorders and an intervention of high-dose antioxidants and zinc in the Age-Related Eye Disease Study: AREDS Report No. 13. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(5):716-726.
65. Chong EW, Wong TY, Kreis AJ, et al. Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 335(7623): 755.

66. Marshall LL, Roach JM. Prevention and treatment of age-related macular degeneration: an update for pharmacists. *Consult Pharm* 2013; 28(11):723-37.
67. Rotstein NP, Politi LE, German OL, et al. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(5):2252-9.
68. Arnarsson A, Sverrisson T, Stefansson E, et al. Risk factors for five-year incident age-related macular degeneration: the Reykjavik Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2006; 142(3):419-428.
69. Chua B, Flood V, Rochtchina E, et al. Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(7):981-986.
70. San Giovanni JP, Chew EY, Clemons TE, et al. The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 20. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(5):671-679.
71. San Giovanni JP, Chew EY, Agron E, et al. The relationship of dietary omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake with incident age-related macular degeneration: AREDS Report No. 23. *Arch Ophthalmol* 2008; 126(9):1274-1279.
72. Dawczynski J, Jentsch S, Schweitzer D, et al. Long term effects of lutein, zeaxanthin and omega-3-LCPUFAs supplementation on optical density of macular pigment in AMD patients: the LUTEGA study. *Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013.
73. Tan JS, Wang JJ, Flood V, et al. Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2009; 127(5): 656-665.
74. Chong EW, Robman LD, Simpson JA, et al. Fat consumption and its association with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2009; 127(5):674-680.
75. Sheu SJ, Liu NC, Ou CC, et al. Resveratrol stimulates mitochondrial bioenergetics to protect retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(9):6426-38.

76. Seddon JM, Cote J, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Arch Ophthalmol* 2003; 121 (12): 1728-37.

77. Ho AC, Maguire MG, Yoken J, et al. Laser-induced drusen reduction improves visual function at 1 year. Choroidal Neovascularization Prevention Trial Research Group. *Ophthalmology* 1999; 106:1367.

78. Laser treatment in eyes with large drusen. Short-term effects seen in a pilot randomized clinical trial. Choroidal Neovascularization Prevention Trial Research Group. *Ophthalmology* 1998; 105:11.

79. Owens SL, Bunce C, Brannon AJ, et al. Prophylactic laser treatment hastens choroidal neovascularization in unilateral age-related maculopathy: final results of the drusen laser study. *Am J Ophthalmol* 2006; 141:276.

80. Friberg TR, Musch DC, Lim JJ, et al. Prophylactic treatment of age-related macular degeneration report number 1: 810-nanometer laser to eyes with drusen. Unilaterally eligible patients. *Ophthalmology* 2006; 113:622.e1.

81. Complications of Age-Related Macular Degeneration Prevention Trial Research Group. Laser treatment in patients with bilateral large drusen: the complications of age-related macular degeneration prevention trial. *Ophthalmology* 2006; 113:1974.

82. Parodi MB, Virgili G, Evans JR. Laser treatment of drusen to prevent progression to advanced age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD006537.

83. Lim JH, Wickremasinghe SS, Xie J, et al. Delay to treatment and visual outcomes in patients treated with anti-vascular endothelial growth factor for age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2012; 153:678.

84. Ficha técnica del Lucentis ®.

85. Chang TS, Bressler NM, Fine JT, et al. Improved vision-related function after ranibizumab treatment of neovascular age-related macular degeneration: results of a randomized clinical trial. *Arch Ophthalmol* 2007; 125:1460.

86. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1432.

87. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 2009; 116:57.
88. Abraham P, Yue H, Wilson L. Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER study year 2. *Am J Ophthalmol* 2010; 150:315.
89. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1419.
90. Kaiser PK, Blodi BA, Shapiro H, et al. Angiographic and optical coherence tomographic results of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2007; 114:1868.
91. Steinbrook R. The price of sight--ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1409.
92. Epstein P. Trials that matter: two faces of progress in the treatment of age-related macular degeneration. *Ann Intern Med* 2007; 146:532.
93. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Martin DF, Maguire MG, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology* 2012; 119:1388.
94. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, et al. Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. *Lancet* 2013; 382:1258.
95. Ficha técnica de Macugen®
96. Ficha técnica de Aflibercept®
97. Heier JS, Brown DM, Chong V, et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012; 119:2537.
98. Schmidt-Erfurth U, Kaiser PK, Korobelnik JF, et al. Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology* 2014; 121:193.

99. Chang AA, Li H, Broadhead GK, et al. Intravitreal aflibercept for treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2014; 121:188.
100. Tufail A, Patel PJ, Egan C, et al. Bevacizumab for neovascular age related macular degeneration (ABC Trial): multicentre randomised double masked study. *BMJ* 2010; 340:2459.
101. Schmidt-Erfurth U. Clinical safety of ranibizumab in age-related macular degeneration. *Expert Opin Drug Saf* 2010; 9:149.
102. Choi DY, Ortube MC, McCannel CA, et al. Sustained elevated intraocular pressures after intravitreal injection of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib. *Retina* 2011; 31:1028.
103. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004; 351:2805.
104. Campbell RJ, Gill SS, Bronskill SE, et al. Adverse events with intravitreal injection of vascular endothelial growth factor inhibitors: nested case-control study. *BMJ* 2012; 345:4203.
105. Wong TY, Liew G, Mitchell P. Clinical update: new treatments for age-related macular degeneration. *Lancet* 2007; 370:204.
106. CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2011; 364:1897.
107. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration. *Lancet* 2012; 379:1728.
108. Virgili G, Bini A. Laser photocoagulation for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD004763.
109. Arroyo JG, Michaud N, Jakobiec FA. Choroidal neovascular membranes treated with photodynamic therapy. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:898.
110. Potter MJ, Szabo SM. Recurrence of choroidal neovascularisation after photodynamic therapy in patients with age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:753.
111. Söderberg AC, Algvere PV, Hengstler JC, et al. Combination therapy with low-dose transpupillary thermotherapy and intravitreal

ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: a 24-month prospective randomised clinical study. *Br J Ophthalmol* 2012; 96:714.

112. Antoszyk AN, Tuomi L, Chung CY, et al. Ranibizumab combined with verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration (FOCUS): year 2 results. *Am J Ophthalmol* 2008; 145:862.

113. Lazic R, Gabric N. Verteporfin therapy and intravitreal bevacizumab combined and alone in choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2007; 114:1179.

114. Costa RA, Jorge R, Calucci D, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in combination with verteporfin photodynamic therapy for choroidal neovascularization associated with age-related macular degeneration (IBeVe Study). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245:1273.

115. Kaiser PK, Registry of Visudyne AMD Therapy Writing Committee, Boyer DS, et al. Verteporfin photodynamic therapy combined with intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2009; 116:747.

116. Hawkins BS, Bressler NM, Miskala PH, et al. Surgery for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no. 11. *Ophthalmology* 2004; 111:1967.

117. Bressler NM, Bressler SB, Childs AL, et al. Surgery for hemorrhagic choroidal neovascular lesions of age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no. 13. *Ophthalmology* 2004; 111:1993.

118. Giansanti F, Eandi CM, Virgili G. Submacular surgery for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD006931.

119. Chen FK, Patel PJ, Uppal GS, et al. Long-term outcomes following full macular translocation surgery in neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2010; 94:1337.

120. Sivagnanavel V, Evans JR, Ockrim Z, et al. Radiotherapy for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD004004.

121. Du Vigneaud V. A trial of research in sulfur chemistry and metabolism and related fields. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1952:213.

122. McCully, KS. Vascular pathology of homocysteinemia. *Am J Pathol.* 1969; 56:111–128.
123. Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997; 272:17012–17.
124. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91:308–318.
125. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem* 1997; 272:1935–1942.
126. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277:1775–1781.
127. Boushey C. Quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995; 247:1049-1057.
128. Goyette P, Sumner JS, Milos R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet.* 1994; 7:195–200.
129. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, et al. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotyping/phenotyping correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1052–1059.
130. Durand P, Prost M, Loreau N, et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001; 81:654–672.
131. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, et al. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2003; 62–81.
132. Cattaneo M, Lombardi R, Lecchi A, et al. Low plasma levels of vitamin B6 are independently associated with a heightened risk of deep-vein thrombosis. *Circulation* 2001; 104:2442–6.
133. Cumurcu S, Sahin E, Aydin E. Serum homocysteine, vitamin B 12 and folic acid levels in different types of glaucoma. *BMC Ophthalmol* 2006; 6:6.

134. Puustjarvi H, Blomster M, Kontkanen K, et al. Plasma and aqueous humour levels of homocysteine in exfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp. Ophthalmol* 2004; 242: 749–754.
135. Zetterberg G, Tasa JA, Prince M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms in patients with cataract, *Am. J. Ophthalmol* 2005; 140:932–934
136. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinaemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270:2693–2698.
137. Seddon JM, Gensler G, Klein ML, et al. Evaluation of plasma homocysteine and risk of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2006; 141:201-3.
138. Axer-Siegel R, Bourla D, Ehrlich R, et al. Association of Neovascular Age-related Macular Degeneration and Hyperhomocysteinemia *Am J Ophthalmol* 2004; 137:84–89.
139. Evereklioglu C, Er H, Doganay S, et al. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decrease antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Doc Ophthalmol* 2003; 106:129-136.
140. Janel N, Robert K, Chabert C, et al. Mouse liver paraoxonase-1 gene expression is downregulated in hyperhomocysteinemia. *Thromb. Haemost* 2004; 92: 221-222.
141. Baskol G, Karakucuk S, Oner AO, et al. Serum Paraoxonase 1 activity and peroxidation levels in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 2006; 1:12-16.
142. Javadzadeh A, Ghorbanihaghjo A, Bahreini E, et al. Plasma oxidized LDL and thiol-containing molecules in patients with exudative age-related macular degeneration. *Mol Vis* 2010; 16:2578-84.
143. Kluijtmans LAJ, Young IS, Boreham CA, et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003; 101:2483-88.
144. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr* 2005; 82(4):806-812.

145. Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, et al. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases. *JAMA* 2006; 296(22):2720-2726.
146. Lip PL, Blann AD, Hope-Ross M, et al. Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology* 2001; 108(4):705-710.
147. Rochtchina E, Wang JJ, Flood VM, et al. Elevated serum homocysteine, low serum vitamin B12, folate, and age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2007; 143(2):344-346.
148. Nowak M, Swietochowska E, Wielkoszynski T, et al. Homocysteine, vitamin B12, and folic acid in age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol* 2005; 15(6):764-767.
149. Kamburoglu G, Gumus K, Kadayifcilar S, et al. Plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244(5):565-569.
150. William C, Glynn R, Chew E, et al. Folic Acid, Pyridoxine, and Cyanocobalamin Combination Treatment and Age-Related Macular Degeneration in Women. *Arch Intern Med* 2009; 169(4):335-341.
151. Gopinath B, Flood VM, Rochtchina E, et al. Homocysteine, folate, vitamin B-12, and 10-y incidence of age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr*. 2013.
152. Hyman L, Schachat AP, He Q, et al. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2000; 117:351-358.
153. Mitchell P, Smith W, Tan JSL, et al. Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: The Blue Mountains eye study. *Ophthalmology* 2007; 114:1143-1150.
154. Clemons TE, Klein R, Milton RC, et al. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors for the incidence of advanced age-related macular degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmol* 2005; 112: 533-539.

155. Deng Y, Klein R, Klein BEK, et al. Cardiovascular disease, its risk factors and treatment, and age-related macular degeneration: Women's health initiative sight exam ancillary study. *Am J Ophthalmol* 2007; 143:473–483.
156. Yang K, Wang FH, Liang YB, et al. Associations between cardiovascular risk factors and early age-related macular degeneration in a rural chinese adult population. *Retina* 2014
157. Wu J, Uchino M, Sastry SM, et al. Age-Related Macular Degeneration and the Incidence of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2014; 9(3): e89600.
158. Tan JS, Wang JJ, Liew G, et al. Age-related macular degeneration and mortality from cardiovascular disease or stroke. *Br J Ophthalmol* 2008; 92:509–512.
159. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 2010; 10:31.
160. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29: 95–112.
161. Sofat R, Casas JP, Kumari M, et al. Genetic variation in complement factor H and risk of coronary heart disease: eight new studies and a meta-analysis of around 48,000 individuals. *Atherosclerosis* 2010; 213:184–190.
162. Friedman E. The role of the atherosclerotic process in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2000; 130:658–663.
163. Shaw PX, Zhang L, Zhang M, et al. Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:13757–13762.
164. Tietz NW, ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company 1995; 622-626.
165. Eda S, Kaufmann J, Roos W, et al. Development of a new microparticle-enhanced turbidimetric assay for C-reactive protein with superior features in sensivity and dynamic range. *J Clin Lab Anal* 1998; 12(3):137-144.

166. Lombardi A, Mondonico P, Preda L, et al. Method for determination of functional (clottable) fibrinogen by the new family of ACL coagulometers. *Tromb Res* 1988; 52:453–468.
167. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007; 25:1105.
168. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364:937.
169. The Eye Disease Case-Control study-Goup. Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. The Eye Disease Case-Control Study Group. *Arch Ophthalmol* 1992; 110:1701–1708.
170. Reynolds R, Rosner B, Seddon JM. Serum lipid biomarkers and hepatic lipase gene associations with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2010; 117:1989–1995.
171. Nowak M, Swietochowska E, Marek B, et al. Changes in lipid metabolism in women with age-related macular degeneration. *Clin Exp Med* 2005; 4:183–187
172. Hogg RE, Woodside JV, Gilchrist SE, et al. Cardiovascular disease and hypertension are strong risk factors for choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2008; 115:1046–1052 e1042.
173. Ulas F, Balbaba M, Ozmen S, et al. Association of dehydroepiandrosterone sulfate, serum lipids, C-reactive protein and body mass index with age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol* 2013.
174. Delcourt C, Michel F, Colvez A, et al. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol* 2001; 8:237–249.
175. Hyman L, Schachat AP, He Q, et al. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. *Arch Ophthalmol* 2000; 118:351–358.

176. Klein R, Klein BE, Tomany SC, et al. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2003; 110:1273–1280
177. Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, et al. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch Ophthalmol* 2010; 128: 750–758.
178. Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, et al. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology* 2004; 111:1280–1287.
179. Buch H. Fourteen-year incidence of age-related maculopathy and cause-specific prevalence of visual impairment and blindness in a Caucasian population: the Copenhagen City Eye Study. *Acta Ophthalmol Scand* 2005; 83:400–401.
180. Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, Korobelnik JF, et al. Elevated High-Density Lipoprotein Cholesterol and Age-Related Macular Degeneration: The Alienor Study. *PLoS One* 2014; 9(3):e90973.
181. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, et al. The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol* 2011; 95:1638–1645.
182. Ebrahimi KB, Handa JT. Lipids, lipoproteins, and age-related macular degeneration. *J Lipids* 2011: 802059.
183. Smith W, Mitchell P, Leeder SR, et al. Plasma fibrinogen levels, other cardiovascular risk factors, and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:583–587.
184. G HB, Rao VS, Kakkar VV. Friend Turns Foe: Transformation of Anti-Inflammatory HDL to Proinflammatory HDL during Acute-Phase Response. *Cholesterol* 2011: 274629.
185. Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. *Open Biochem J* 2012; 6: 78–93
186. Humphrey LL, Fu R, Rogers K, et al. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:1203.

187. Ghosh S, Saha M, Das D. A study on plasma homocysteine level in age-related macular degeneration. *Nepal J Ophthalmol* 2013; 5(10):195-200.
188. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med* 2012; 367:1310.
189. Buckley DI, Fu R, Freeman M, et al. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2009; 151:483.
190. Wilson PW, Pencina M, Jacques P, et al. C-reactive protein and reclassification of cardiovascular risk in the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2008; 1:92.
191. McGwin G, Hall TA, Xie A, et al. The relation between C reactive protein and age related macular degeneration in the Cardiovascular Health Study. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:1166-1170.
192. Klein R, Klein BE, Marino EK, et al. Early age-related maculopathy in the cardiovascular health study. *Ophthalmol.* 2003; 110:25-33.
193. Seddon JM, Gensler G, Milton RC, et al. Association between C-Reactive Protein and Age-Related Macular Degeneration. *JAMA* 2004; 299:704-710.
194. Vine AK, Stader J, Branham K, et al. Biomarkers of Cardiovascular Disease as Risk Factors. *Ophthalmology* 2005; 112(12):2076-80.
195. Klein R, Myers CE, Cruickshanks KJ, et al. Markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction and the 20-year cumulative incidence of early age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *JAMA Ophthalmol* 2014; 132(4):446-55.
196. Subhi Y, Singh A, Krüger M, et al. In patients with neovascular age-related macular degeneration, physical activity may influence C-reactive protein levels. *Clin Ophthalmol* 2014; 4:15-21.
197. Boekhoorn SS, Vingerling JR, Witterman JC. C-reactive protein level and risk of aging macula disorder. *Arch Ophthalmology* 2007; 125(10):1396-

1401.

198. Mitta VP, Christen WG, Glynn RJ, et al. C-reactive protein and the incidence of macular degeneration: pooled analysis of 5 cohorts. *JAMA Ophthalmol* 2013; 131(4):507-13.

199. Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J, et al. Foveolar choroidal blood flow in age related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:385-390.

200. Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, et al. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 2000; 14:835-846.

201. Lip PL, Blann AD, Hope-Ross M, et al. Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmol* 2001; 108:705-710.

202. Klein R, Klein BE, Jensen SC, et al. Age-related maculopathy in a multiracial United States population: the National Health and Nutrition Examination Survey III. *Ophthalmology* 1999; 106:1056-65.

203. Klein R, Knudtson MD, Klein BE, et al. Inflammation, complement factor h, and age-related macular degeneration: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Ophthalmology* 2008; 115:1742-9.

204. Rudnicka AR, MacCallum PK, Whitelocke R, et al. Circulating markers of arterial thrombosis and late-stage age-related macular degeneration: a case-control study. *Eye (Lond)* 2010; 24(7):1199-206.

205. Schwesinger C, Yee C, Rohan RM. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 2001; 158:1161-72.

206. Simons M. Angiogenesis: Where do we stand now? *Circulation*. 2005; 111:1556-66.

207. Juan-Babot JO, Martínez-González J, Berrozpe M, et al. Neovascularization in human coronary arteries with lesions of different severity.

Rev Esp Cardiol 2003; 56:978–86.

208. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273:30336–43.

209. Tuñón J, Ruiz-Moreno JM, Martín-Ventura JL, et al. Cardiovascular Risk and antiangiogenic therapy for age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2009; 54(3):339-48.

210. Drolet DW, Nelson J, Tucker CE, et al. Pharmacokinetics and safety of an antivascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. *Pharm Res* 2000; 17:1503–10.

211. Gaudreault J, Fei D, Rusit J, et al. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:726–33.

212. Papadopoulou DN, Mendrinou E, Mangioris G, et al. Intravitreal ranibizumab may induce retinal arteriolar vasoconstriction in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2009; 116:1755-61.

213. Brown DM, Campochiaro PA, Singh RP, et al. Ranibizumab for macular edema following central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2010; 117(6):1124–1133.

214. Elman MJ, Bressler NM, Qin H, et al. Expanded 2-year follow-up of Ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2011; 118(4):609–14.

215. Winnik S, Lohmann C, Siciliani G, et al. Systemic VEGF inhibition accelerates experimental atherosclerosis and disrupts endothelial homeostasis—implications for cardiovascular safety. *Int J Cardiol* 2013; 168:2453–2461.

216. Ruiz-Moreno JM, Montero J. Fármacos antiangiogénicos en la patología del segmento posterior. Antiinflamatorios y antiangiogénicos intraoculares. *Ed.S.E.O.* 2004; 93-11.

217. Ueta T, Noda Y, Toyama T, et al. Systemic Vascular Safety of Ranibizumab for Age-related Macular Degeneration: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. *Ophthalmology* 2014.

218. Singerman LJ, Masonson H, Patel M, et al. Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: third-year safety results of the VEGF inhibition study in ocular neovascularization (VISION) trial. *Br J Ophthalmol* 2008; 92 (12):1606-11.

219. Costagliola C, Agnifili L, Arcidiacono B, et al. Systemic thromboembolic adverse events in patients treated with intravitreal anti-VEGF drugs for neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12(10):1299-313.

220. Semeraro F, Morescalchi F, Duse S, et al. Systemic thromboembolic adverse events in patients treated with intravitreal anti-VEGF drugs for neovascular age-related macular degeneration: an overview. *Expert Opin. Dnrg Saf.* (2014) 13(6):785-802.

221. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, et al. IVAN study investigators. Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularization: 2-years findings of the IVAN randomised controlled trial. *Lancet* 2013; 12:382(9900):1258-67.

222. Nita M, Grzybowski A, Ascaso FJ, Huerva V. Age-related macular degeneration in the aspect of chronic low-grade inflammation (pathophysiological parainflammation). *Mediators Inflamm.* 2014.

223. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al; MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355:1419-31.

224. Abraham P, Yue H, Wilson L. Randomized, double-masked, sham controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER study year 2. *Am J Ophthalmol* 2010; 150(3):315-324.

225. Schmidt-Erfurth U, Eldem B, Guymer R, et al. EXCITE Study Group. Efficacy and safety of monthly versus quarterly ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration: EXCITE study. *Ophthalmology* 2011; 118(5):831-9.

226. Holz FG, Amoaku W, Donate J, et al. SUSTAIN Study Group. Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: the SUSTAIN Study. *Ophthalmology* 2011; 118(4): 663-71.

227. Mitchell P, Korobelnik JF, Lanzetta P, et al. Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials. *Br J Ophthalmol* 2010; 94(1): 2-13.
228. Liew G, Mitchell P. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2007; 356(7):747-8.
229. Boyer DS, et al. A safely overview of ranibizumab in patients with wet AMD; ANCHOR, MARINA, PIER and SAILOR (2008). Presented at the annual meeting of the American academy of ophthalmology; 2008; Atlanta, Georgia.
230. Ciulla TA, Rosenfeld PJ. Antivascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 2009; 20(3):158-65.
231. Ueta T, Yanagi Y, Tamaki Y, et al. Cerebrovascular accidents in ranibizumab. *Ophthalmology* 2009; 116(2):362..
232. Singer MA, Awh CC, Sadda S, et al. HORIZON: an open-label extension trial of ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012; 119(6): 1175-83.
233. Silva R, Axer-Siegel R, Eldem B, et al. SECURE Study Group. The SECURE study; long-term safety of ranibizumab 0.5 mg in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2013; 120(1): 130-9.
234. Blasiak J, Petrovski G, Vereb Z, et al. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *Biomed Res Int* 2014; 768026.
235. Murdaugh LS, Avalle LB, Mandal S, et al. Compositional studies of human RPE lipofuscin. *Journal of Mass Spectrometry* 2010; 45(10):1139–1147.
236. Kerr BA, Byzova TV. The dark side of the oxidative force in angiogenesis. *Nat Med* 2012; 18(8):1184-1185.
237. Falavarjani KG, Nguyen, QD. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye (Lond)* 2013; 27(7):787-94.
238. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller cells and photoreceptors. *PLoS One* 2008; 3(11):e3554.

239. Koubaa N, Nakbi A, Smaoui M, et al. Hiperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: Role of genetic and dietary factors. *Clin Biochem* 2007; 40 (13-14):1007-14.
240. Demircan C, Cikrikler HI, Engindeniz Z, et al. Comparison of the effectiveness of intravenous diltiazem and metoprolol in the management of rapid ventricular rate in atrial fibrillation. *Emerg Med J* 2005; 22(6):411-4.
241. Dávalos A, Gómez C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J Agric Food Chem* 2004; 52:48-54.
242. Lucas-Abellán C, Fortea MI, Gabaldon JA, et al. Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. *Food Chem* 2008; 111:262-267.
243. Prohaska JR, Oh SH, Hoekstra WG, et al. Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochem & Biophys. Res. Commun* 1997; 74:64-71.
244. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 2003; 36(1):79-87.
245. Woolliams JA, Suttle NF, Wiener G, et al. The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content. *J Agric Sci* 1983; 100: 441-449.
246. Buss H, Chan TP, Sluis KB, et al. Protein Carbonyl Measurement By A Sensitive ELISA Method. *Free Rad Biol Med* 1977; 23:361.
247. Julius M, Lang CA, Gliebemant L, DiFrancisco W, Schork A. Glutathione and morbidity in a community based sample of elderly. *J Clin Epidemiol* 1994; 47: 1021-26.
248. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Jr, Reed RL, et al. Glutathione in human plasma decline: in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24:699-704.
249. Cai J, Nelson KC, Wu M, Stemberg P, Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* 19: 205-21.

250. Qin L, Mroczkowska SA, Ekart A, Patel SR, Gibson JM, Gherghel D. Patients with early age-related macular degeneration exhibit signs of macro- and micro-vascular disease and abnormal blood glutathione levels. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014; 252(1):23-30.
251. Uno K, Nicholls SJ. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis. *Biomark Med.* 2010; 4:361-73.
252. Popovici I, Daraba O, Petrariu FD. Age related macular degeeneration: biochemical aspects the journal of preventive medicine. 1994: 12:22-29.
253. Prashar S, Pandav SS, Gupta A, Nath R. Antioxidant enzymes in RBCs as a biological index of age related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 1993: 71:214-18.
254. Cohen SM, Olin KL, Feuer WJ, Hjelmeland L, Keen CL, Morse LS. Low glutathione reductase and peroxidase activity in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 1994: 78: 791-94.
255. Venza I, Visalli M, Cucinotta M, et al. Association between oxidative stress and macromolecular damage in elderly patients with age-related macular degeneration. *Aging Clin Exp Res* 2012; 24:21-27.
256. Serap Y, Rezan H, Koray B, Mehmet B, Ulku C, Pelin E. Antioxidant statues in senile macular degeneration. *Acta Physiologica* 2011; 203: 686.
257. Shen XL, Jia JH, Zhao P, et al. Changes in blood oxidative and antioxidant parameters in a group of Chinese patients with age-related macular degeneration. *Nutr Health Aging* 2012; 16:201-204.
258. Kilmer S. Mc Cully. Homocysteine: Biosynthesis and health implications. *New developments in medical research.* Nova Biomedical. 2014.
259. Viktorov IV, Aleksandrova OP, Alekseeva NY. Homocysteine toxicity in organotypic cultures of rat retina. *Bull Exp Biol Med* 2006; 141:471 – 4.
260. Da Cunha AA, Ferreira AG, Loureiro SO, et al. Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats. *Neurochem Res* 2012; 37:1660 – 9.
261. Pushpakumar SB, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction: The link between homocysteine and hydrogen sulfide. *Curr Med Chem* 2014.

262. Roybal CN, Yang S, Sun CW, et al. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem* 2004; 279:14844-52.
263. Vikram S, Brar K, Chalam V. VEGF Inhibitor Induced Oxidative Stress in Retinal Ganglion Cells. *Studies on Retinal and Choroidal Disorders . Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* 2012; 585-593.
264. Lee I, Lee H, Kim JM, et al. Short-term hyperhomocysteinemia induced oxidative stress activates retinal glial cells and increases vascular endothelial growth factor expression in rat retina. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 7:1203-10.
265. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473(7347):298-307.
266. Keles S, Ates O, Kartal B, Alp HH, Ekinçi M, Ceylan E, et al. Evaluation of cardiovascular biomarkers in patients with age-related wet macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2014; 8: 1573-8.
267. Coral K, Angayarkanni N, Gomathy N, et al. Homocysteine levels in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment: it is modulating role on lysyl oxidase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(8):3607-12.
268. Lim CP, Loo AV, Khaw KW, et al. Plasma, aqueous and vitreous homocysteine levels in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2012; 96:704-7.

ANEXO 1.
CONSENTIMIENTO INFORMADO



UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,con

DNI:.....

DECLARO:

Haber sido informado/a minuciosamente del estudio **“EFECTO DE UNA BEBIDA RICA EN ANTIOXIDANTES SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO”**, así como de todos los procedimientos de la investigación. Los investigadores que van a acceder a mis datos personales y a los resultados de las pruebas son los investigadores participantes en el estudio.

Asimismo, he podido hacer preguntas del estudio, comprendiendo que me presto de forma voluntaria al mismo y que en cualquier momento puedo abandonarlo sin que me suponga perjuicio de ningún tipo.

CONSIENTO:

1.-) Someterme a las pruebas analíticas, que se detallan en el ensayo clínico.

2.-) El uso de los datos obtenidos según lo indicado en el párrafo siguiente:

En cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le comunicamos que la información que ha facilitado y la obtenida como consecuencia de las exploraciones a las que se va a someter pasará a formar parte del fichero automatizado INVESALUD, cuyo titular es la FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO, con la finalidad de INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN LAS ÁREAS DE CONOCIMIENTO DE SALUD Y DEPORTES. Tiene derecho a acceder a esta información y cancelarla o rectificarla, dirigiéndose al domicilio de la entidad, en Avda. de los Jerónimos de Guadalupe 30107 (Murcia). Esta entidad le garantiza la adopción de las medidas oportunas para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos.



UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

Vicerrectorado de Investigación

CONSENTIMIENTO INFORMADO

En Guadalupe (Murcia) a 9 de Enero de 2009

Fdo:.....

ANEXO 2.
COMITÉ DE ÉTICA



Los investigadores que soliciten la evaluación de este Comité, deberán presentar en el Servicio de Investigación de la Universidad junto con la documentación solicitada este Anexo I debidamente cumplimentado.

INDICAR SI LA PROPUESTA CONTEMPLA ALGUNO DE LOS SIGUIENTES ASPECTOS:		SI	NO
A	Investigación experimental clínica con seres humanos.	x	
B	Utilización de tejidos humanos procedentes de pacientes, tejidos embrionarios o fetales.		x
C	Utilización de tejidos humanos, tejidos embrionarios o fetales procedentes de bancos de muestras o tejidos.		x
D	Investigación observacional con seres humanos o uso de datos personales, información genética, etc.		x
E	Experimentación animal.		x
F	Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o las plantas.		x
G	Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs).		x

Datos del Investigador Principal	
Apellidos y nombre:	Cristina García Viguera. Pilar Zafrilla Rentero
Grupo de Investigación:	Nutrición y estrés oxidativo
Correo electrónico:	mpzafrilla@ucam.edu Teléfono: 685607716
Denominación de la convocatoria:	Ministerio de Educación y Ciencia

El abajo firmante, en calidad de investigador principal de este proyecto informa que:

- La investigación propuesta respeta los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, de la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, y del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio de Oviedo relativo a los derechos humanos y la biomedicina).
- Conoce y cumplirá la legislación vigente y otras normas reguladoras, pertinentes al proyecto, en materia de ética, experimentación animal o bioseguridad.

En Murcia, a 9.de. Enero de 2009.

El Investigador Principal,

Fdo.: Pilar Zafrilla.

Documentación que se ha de adjuntar:

- **En los supuestos A, B y C** y si el centro donde se llevará a cabo la experimentación o que suministrará las muestras es distinto a la UCAM, debe adjuntar el informe del Comité Ético del centro correspondiente.
- **En el supuesto C**, si no se tratara de un centro con Comité de Ética acreditado se deberá adjuntar la autorización de uso de las muestras, señalando la extensión de esta autorización (usos restringidos al proyecto, o para otros usos relacionados). En cualquier caso hay que señalar si las muestras son abiertas, están codificadas o son anónimas.
- **En el supuesto D** si la investigación es prospectiva, se deberá aportar el documento de consentimiento informado utilizado donde conste la información detallada que recibirá el participante en el estudio. Si es retrospectiva se deberá hacer un compromiso de confidencialidad sobre los posibles datos identificativos de los participantes.
- **En el supuesto E** de deberá adjuntar el Informe del Responsable del Animalario con el V.º B.º del Asesor en Bienestar Animal en el que se van a mantener los animales, indicando el nº de Registro del mismo, verificación del procedimiento y la autorización para la estabulación de los mismos, además, en el caso de utilizar material biológico infeccioso, adjuntar el Informe del Responsable de Seguridad Biológica del Centro y en los casos de inoculación de compuestos marcados con radioisótopos, también se deberá adjuntar Informe del responsable de Radioprotección del Centro en el que se verifique el procedimiento.
- **En los supuestos F y G** se debe adjuntar el informe del Comité de Bioseguridad o del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del Centro en el que se llevará a cabo la experimentación. En ambos casos se deberán enumerar los agentes biológicos utilizados y describir las medidas de contención del laboratorio donde se va a realizar los trabajos.