



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias Sociales y de la
Salud

Estudio de la influencia
de los polimorfismos genéticos
en la respuesta a tratamiento con ranibizumab
en la degeneración macular asociada a la edad

Autora:

María Dolores Miranda Rollón

Directores:

Dr. D. Jerónimo Jesús Lajara Blesa

Dra. Dña. María del Mar Martínez Senac

Dr. D. Pablo Conesa Zamora

Murcia, mayo de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias Sociales y de la
Salud

Estudio de la influencia
de los polimorfismos genéticos
en la respuesta a tratamiento con ranibizumab
en la degeneración macular asociada a la edad

Autora:

María Dolores Miranda Rollón

Directores:

Dr. D. Jerónimo Jesús Lajara Blesa

Dra. Dña. María del Mar Martínez Senac

Dr. D. Pablo Conesa Zamora

Murcia, mayo de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN**

El Dr. D. Jerónimo Jesús Lajara Blesa, la Dra. Dña. María del Mar Martínez Senac y el Dr. D. Pablo Conesa Zamora como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la influencia de los polimorfismos genéticos en la respuesta a tratamiento con ranibizumab en la degeneración macular asociada a la edad” realizada por Dña. María Dolores Miranda Rollón en el Departamento de Ciencias sociales y de la salud **autorizan su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 19 de mayo de 2017

Dr. Lajara Blesa

Dra. Martínez Senac

Dr. Conesa Zamora

RESUMEN

Introducción: La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda o exudativa es una enfermedad ocular degenerativa caracterizada por la formación de lesiones neovasculares coroideas (NVC) que pueden causar pérdida severa de visión. La etiopatogenia de esta entidad es multifactorial, jugando la genética un papel fundamental en su desarrollo. El tratamiento más común y eficaz es la inyección intravítrea de fármacos antiangiogénicos que actúan sobre la proteína factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), como es el caso de ranibizumab. El objetivo de este trabajo es evaluar la relación entre la respuesta al tratamiento antiangiogénico en pacientes con DMAE exudativa y los polimorfismos en los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353), relacionados en el proceso de angiogénesis, y *RAD51B* (rs8017304), implicado en el proceso de reparación del ADN.

Método: Se trata de un estudio retrospectivo transversal que incluye una cohorte de 125 pacientes (125 ojos) con DMAE exudativa tratados con ranibizumab. Los pacientes recibieron un año de tratamiento según criterios del estudio SUSTAIN (*Study of Ranibizumab in Patients with Subfoveal Choroidal Neovascularization Secondary to Age-Related Macular Degeneration*). Los pacientes con NVC recibieron una dosis de carga de tres inyecciones mensuales y se retrataron aquellos que perdieron una línea de visión en la escala de Snellen o aumentaron su espesor macular en 100 µm medidas por Tomografía de Coherencia Óptica (OCT). Los polimorfismos en los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304) se determinaron por discriminación de alelos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*, PCR) usando sondas KASPar SNP Genotyping System (LGC, Middlesex, UK).

Resultados: Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los polimorfismos *TGFBR1* (rs334353), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) y *RAD51B* (rs8017304) y la respuesta a ranibizumab.

El número de inyecciones mostró diferencias significativas en función de las variantes genéticas de *RAD51B*, siendo este parámetro en la variante GG significativamente inferior respecto a AA (U = 468, z = -2,25, p = 0,024) y GA (U = 672,0, z = - 2,59, p = 0,010).

La ganancia de agudeza visual postratamiento en la variante TT del gen *TGFBR1* (rs334353) fue significativamente inferior con respecto a GG+TG (p= 0,048). La reducción de espesor macular en pacientes portadores de alelo G de *COL8A1L/FILIP1L* fue significativamente superior con respecto a los pacientes portadores de alelo T (p=0,022). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735) y la respuesta a tratamiento antiangiogénico.

Conclusión: Parece existir una relación entre los polimorfismos de los genes *TGFBR1* (rs334353), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) y *RAD51B* (rs8017304) y la respuesta a tratamiento con ranibizumab intravítreo en pacientes con NVC, aunque es necesario realizar más estudios farmacogenéticos para averiguar el mecanismo de esta asociación.

PALABRAS CLAVE: DMAE, ranibizumab, *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353), *RAD51B* (rs8017304)

ABSTRACT

Introduction: Wet or exudative age-related macular degeneration (AMD) is a degenerative ocular disease characterized by the formation of choroidal neovascular lesions (CNV) that can cause severe loss of vision. Etiopathogenesis of this entity is multifactorial and genetics play a role in its development. Intravitreal antiangiogenic injections are the most common and effective treatment. These drugs act on the protein vascular endothelial growth factor (VEGF), as it is the case of ranibizumab. The aim of this study is to evaluate the relationship between the response to antiangiogenic treatment in patients with exudative age-related macular degeneration (AMD) and the presence of polymorphisms in genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353), involved in the angiogenesis process, and *RAD51B* (rs8017304), involved in the DNA repair process.

Method: This is a retrospective cross-sectional study that included a cohort of 125 patients (125 eyes) with exudative AMD treated with intravitreal ranibizumab. Patients received one year of treatment according to SUSTAIN (Study of Ranibizumab in Patients with Subfoveal Choroidal Neovascularization Secondary to Age-Related Macular Degeneration) study. Patients with CNV received a loading dose of three monthly injections and those who lost a line on the Snellen scale or increased their macular thickness 100 μm in Optical Coherence Tomography (OCT) were retreated. Polymorphisms in *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) and *RAD51B* (rs8017304) genes were determined by allele discrimination using real-time polymerase chain reaction (Real Time Polymerase Chain Reaction, PCR) using KASPar SNP Genotyping System probes (LGC, Middlesex, UK).

Results: Statistically significant differences were found in genotypes of polymorphisms *TGFBR1* (rs334353), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) and *RAD51B* (rs8017304) and the ranibizumab response. The number of injections showed significant differences depending on genetic variants of *RAD51B*. The number of injections in the GG variant significantly lower than AA ($U = 468$, $z = -2.25$, $p = 0.024$) and GA ($U = 672.0$, $z = 2.59$, $p = 0.010$).

Posttreatment visual acuity gain in TT variant of *TGFBR1* gene (rs334353) was significantly lower respect to GG + TG ($p = 0.048$). Macular thickness reduction in patients with *COL8A1L/FILIP1L* G allele was significantly higher than in patients with T allele ($p = 0.022$). No statistically significant differences were found between *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* genotypes (rs 6795735) and antiangiogenic response.

Conclusion: It seems to be a relationship between the polymorphisms in *TGFBR1* (rs334353), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) and *RAD51B* (rs8017304) genes and intravitreal ranibizumab response in patients with CNV. Further pharmacogenetic studies are required to find out the mechanism of this association.

KEY WORDS: AMD, ranibizumab, *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353), *RAD51B* (rs8017304)

Este trabajo se ha financiado gracias al Programa de Apoyo a los grupos de Investigación del Plan Propio de Apoyo a la Investigación 2013-2014 de la Universidad Católica San Antonio de Murcia, que financió el proyecto titulado:

“Estudio de la asociación entre nuevos polimorfismos en genes de susceptibilidad y su respuesta al tratamiento anti-factor de crecimiento endotelial vascular en la Degeneración Macular Asociada a la Edad de tipo exudativa”.
Proyecto PMAFI/26/14.

A mi hija Irene, motor de mi vida

A mi marido Ignacio, motor de este trabajo y de mi todo

A mis padres, José y Margot, espero que estéis orgullosos de mi

AGRADECIMIENTOS

Al llegar al final de esta Tesis Doctoral sólo pienso en no olvidar a nadie de los que me han ofrecido su ayuda, sincera y generosa, y sin los cuales no hubiese sido posible realizar con éxito este proyecto.

En primer lugar, quiero agradecer de manera especial a mis Directores de Tesis por aceptar la realización de este trabajo bajo su tutela. A la Dra. Martínez Senac por su entrega desinteresada e implicación en la elaboración de esta Tesis, tanto en la parte experimental como en la enseñanza apasionada del papel de investigadora. Siempre recordaré la ilusión y la motivación que he visto en ella. Merry, espero no haberte decepcionado... Al Dr. Conesa Zamora por su confianza en mí para llevar a cabo esta Tesis Doctoral. Sin duda, sus ideas han sido la base fundamental de este trabajo. Y como no, a mi maestro, el Dr. Lajara Blesa, por el profundo respeto que me profesa como amiga y compañera de profesión. Gracias por todos los años de formación compartidos, es un placer haber podido trabajar contigo.

Mención especial merece María Ángeles por su ayuda en la recogida y procesado de las muestras del biobanco. Su colaboración ha sido fundamental.

Agradezco también a mis compañeros del Servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario Universitario de Cartagena: a los oftalmólogos por su ayuda, su aliento de ánimo en todo momento y por permitirme la recogida de datos en nuestra unidad; en especial a Domi, que a pesar de su situación, me ayudó con programas informáticos complicados para mí...; al personal de quirófano, Vicente, Elena, Raquel, Sera, M^a Carmen, por su ayuda en la recogida de las muestras de los pacientes que acudían a su tratamiento; al personal administrativo; a las auxiliares de enfermería Paz y Nieves que citaron a los pacientes; a María José y a Amparo, mi "madre cartagenera", espero no decepcionarte nunca ni a ti ni a Andrés. Gracias por todo vuestro cariño y por considerarme como una hija más.

Nada de esto hubiese sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia. Aprovecho estas líneas para agradecer a mis padres todo lo que me han enseñado y aún más el grandísimo esfuerzo que han hecho para que yo llegase a ser quien

soy. Vuestro amor y confianza en mis estudios son claves en mi vida. Nunca podré devolveros lo que habéis hecho por mí. Sabéis lo mucho que os quiero.

Gracias a mi hermano Alejandro y a mi cuñada Noelia, a mi familia política y a mis amigos, por alegraros de mis logros... A mi Carmen Junceda, por su afecto y enseñanzas para llegar a ser una apasionada Oftalmóloga por encima de todo.

Me siento en la obligación de pedir disculpas a mi hija, Irene, por el tiempo que le he robado... Espero que algún día te pueda compensar... Quiero que sepas que este esfuerzo está dedicado sobre todo a ti y al profundo amor que te tengo... Ojalá que en un futuro te llegues a sentir orgullosa de tu "mamita".

Y para terminar, sin duda, he de agradecer a mi marido su impulso en el inicio y correcciones de este trabajo. A pesar de tus búsquedas de perfección, eres mi motivación y referente de lo que quiero llegar a ser en mi vida. Sabes también que sin ti nunca habría llegado a esto. Muchas gracias, Ignacio. Te quiero.

“Fue el tiempo que pasaste con tu rosa lo que la hizo tan importante”

Antoine de Saint-Exupéry (El Principito)

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

SIGLAS Y ABREVIATURAS	27
ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS.....	31
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	37
1.1. GLOBO OCULAR.....	39
1.1.1. Definición.....	39
1.1.2. Anatomía del globo ocular.....	39
1.1.3. Vascularización del globo ocular.....	40
1.2. COROIDES.....	40
1.3. RETINA.....	41
1.3.1. Definición.....	41
1.3.2. Epitelio pigmentario de la retina	42
1.3.3. Vascularización retiniana.....	43
1.4. MÁCULA.....	43
1.5. DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD.....	44
1.5.1. Definición.....	44
1.5.2. Historia.....	45
1.5.3. Prevalencia de la DMAE.....	45
1.5.4. Clasificación de la DMAE.....	47
1.5.5. Histología y signos de DMAE.....	49
1.5.5.1 Drusas.....	50
1.5.5.2 Atrofia incipiente (atrofia no geográfica).....	51

1.5.5.3 Atrofia geográfica.....	51
1.5.5.4 Neovascularización coroidea.....	52
1.5.6. Factores de riesgo de DMAE.....	52
1.5.6.1. Factores demográficos.....	53
1.5.6.1.1. Edad.....	53
1.5.6.1.2. Sexo.....	53
1.5.6.1.3. Raza.....	53
1.5.6.2. Factores cardiovasculares.....	53
1.5.6.2.1. Aterosclerosis.....	53
1.5.6.2.2. Hipertensión arterial.....	53
1.5.6.2.3. Hipercolesterolemia.....	53
1.5.6.2.4. Diabetes mellitus.....	54
1.5.6.3. Factores tóxicos y nutricionales.....	54
1.5.6.3.1. Tabaco.....	54
1.5.6.3.2. Alcohol.....	54
1.5.6.3.3. Antioxidantes.....	54
1.5.6.3.4. Exposición solar.....	55
1.5.6.4. Factores oculares.....	55
1.5.6.4.1. Hipermetropía.....	55
1.5.6.4.2. Color del iris.....	56
1.5.6.4.3. Cirugía de catarata.....	56
1.5.6.5. Factores hormonales.....	56
1.5.6.6. Enfermedad de Alzheimer.....	56
1.5.7. Etiopatogenia de la DMAE.....	57
1.5.7.1. Papel del estrés oxidativo.....	57

1.5.7.2. Papel de la angiogénesis.....	58
1.5.7.3. Papel del EPR y de la inflamación crónica.....	59
1.5.7.4. Papel del factor de crecimiento vascular endotelial.....	61
1.5.7.5. Papel del factor de crecimiento derivado de plaquetas.....	62
1.5.7.6. Otros factores.....	63
1.5.8. Diagnóstico.....	63
1.5.8.1. Medida de agudeza visual.....	63
1.5.8.2. Test de la rejilla de Amsler.....	65
1.5.8.3. Examen de fondo de ojo.....	66
1.5.8.4. Angiografía con fluoresceína.....	66
1.5.8.5. Angiografía con verde de indocianina.....	68
1.5.8.6. Tomografía de coherencia óptica.....	69
1.5.9. Tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad.....	72
1.5.9.1. Antioxidantes.....	72
1.5.9.2. Fotocoagulación con láser.....	73
1.5.9.3. Cirugía.....	73
1.5.9.3.1. Cirugía submacular.....	73
1.5.9.3.2. Translocación macular.....	74
1.5.9.4. Terapia fotodinámica.....	75
1.5.9.5. Terapia antiangiogénica.....	75
1.5.9.5.1. Pegaptanib sódico.....	75
1.5.9.5.2. Bevacizumab.....	75
1.5.9.5.3. Ranibizumab.....	76
1.5.9.5.5. Aflibercept.....	80
1.5.9.5.6. Otros fármacos.....	81
1.6. FARMACOGENÉTICA.....	83

1.7. GENÉTICA EN LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD.....	85
1.7.1. Susceptibilidad genética en la DMAE.....	85
1.7.1.1. Genes relacionados con la DMAE.....	86
1.7.1.1.1. La vía del complemento.....	87
1.7.1.1.2. El daño oxidativo.....	91
1.7.1.1.2.1. Gen susceptibilidad a la maculopatía asociada a la edad tipo 2 (ARMS2).....	91
1.7.1.1.2.2. Gen de serín peptidasa 1 de alto requerimiento de temperatura (HTRA1).....	92
1.7.1.1.3. La vía de la angiogénesis.....	92
1.7.1.1.3.1. Gen del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	92
1.7.1.1.3.2. Gen del inhibidor tisular de la metaloproteína de matriz 3 (TIMP-3).....	94
1.7.1.1.3.3. Gen de Fibulina-5.....	94
1.7.1.1.3.4. Gen de la lipasa hepática (LIPC).....	95
1.7.1.1.4. Otros genes relacionados con la DMAE.....	95
1.7.1.1.4.1. Gen de la apolipoproteína E (ApoE).....	95
1.7.1.1.4.2. Gen de la enfermedad de Stargardt (ABCA4).....	96
1.7.1.1.5. Otros genes de susceptibilidad de padecer DMAE.....	96
1.7.1.1.5.1. Gen de la desintegrina y metaloproteasa 9 con motivos tipo tromboespondina tipo 1 (ADAMTS9).....	96
1.7.1.1.5.2. Gen de la cadena alfa 1 del colágeno tipo VIII y gen de la filamina A que interactúa con la proteína 1 (COL8A1L/FILIP1L).....	97
1.7.1.1.5.3. Gen del receptor tipo 1 del factor de crecimiento transformante β (TGBR1).....	98
1.7.1.1.5.4. Gen de la proteína RAD 51B (RAD51B).....	99

1.7.2. Farmacogenética y DMAE.....	100
1.7.2.1. Polimorfismos del gen del Factor H del complemento.....	100
1.7.2.2. Polimorfismos en el del factor 3 del complemento.....	101
1.7.2.3. Polimorfismos en el gen <i>ARMS2/HTRA1</i>	101
1.7.2.4. Polimorfismos en el gen <i>VEGF</i>	102
1.7.2.5. Polimorfismos en el gen <i>VEGFR</i>	102
1.7.2.6. Polimorfismos en el gen <i>ApoE</i>	103
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.....	105
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS.....	109
CAPÍTULO IV. OBJETIVOS.....	113
CAPÍTULO V. MATERIAL Y MÉTODO.....	117
5.1. TIPO DE ESTUDIO.....	119
5.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO.....	119
5.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN DE LOS PACIENTES.....	120
5.4. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS.....	121
5.4.1. Determinación de la agudeza visual.....	122
5.4.2. Examen ocular.....	124
5.4.3. Realización de OCT.....	125
5.4.4. Inyección de ranibizumab intravítreo.....	127
5.4.5. Evaluación de la respuesta al tratamiento con ranibizumab.....	128
5.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	130
5.5.1. Extracción y cuantificación del ADN de las muestras.....	130
5.5.2. Estudio de las variantes genéticas.....	131
5.6. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....	137
CAPÍTULO VI. RESULTADOS.....	139

6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS RESULTADOS.....	141
6.1.1. Características de la población a estudio.....	141
6.1.2. Distribución de genotipos para los polimorfismos de los genes <i>ADAMTS9/ADAMTS9-AS2</i> (rs6795735), <i>COL8A1L/FILIP1L</i> (rs13081855), <i>TGFBR1</i> (rs334353) y <i>RAD51B</i> (rs8017304).....	142
6.1.3. Estudio de susceptibilidad a enfermedad entre casos y controles.....	144
6.1.3.1. Influencia del polimorfismo <i>ADAMTS9</i> (rs6795735) en la susceptibilidad a DMAE.....	144
6.1.3.2. Influencia del polimorfismo <i>RAD51B</i> (rs8017304) en la susceptibilidad a DMAE.....	145
6.1.3.3. Influencia del polimorfismo <i>TGFBR1</i> (rs334353) en la susceptibilidad a DMAE.....	145
6.1.3.4. Influencia del polimorfismo <i>COL8A1L/FILIP1L</i> (rs13081855) en la susceptibilidad a DMAE.....	146
6.1.4. Determinación de la asociación de los antecedentes familiares y los polimorfismos de los genes <i>ADAMTS9/ADAMTS9-AS2</i> (rs6795735), <i>COL8A1L/FILIP1L</i> (rs13081855), <i>TGFBR1</i> (rs334353) y <i>RAD51B</i> (rs8017304).....	146
6.2. ANÁLISIS FARMACOGÉNICO DE LOS RESULTADOS.....	147
6.2.1. Influencia del polimorfismo <i>ADAMTS9/ADAMTS9-AS2</i> (rs6795735) en el tratamiento con ranibizumab intravítreo.....	147
6.2.1.1. Análisis del polimorfismo <i>ADAMTS9/ADAMTS9-AS2</i> (rs6795735) según modelo codominante.....	148
6.2.1.2. Análisis del polimorfismo <i>ADAMTS9/ADAMTS9-AS2</i> (rs6795735) según modelo dominante.....	149
6.2.1.3. Análisis del polimorfismo <i>ADAMTS9/ADAMTS9-AS2</i> (rs6795735) según modelo recesivo.....	150
6.2.1.4. Análisis del polimorfismo <i>ADAMTS9/ADAMTS9-AS2</i> (rs6795735) según modelo por alelos.....	151

6.2.2. Influencia del polimorfismo <i>RAD51B</i> (rs8017304) en el tratamiento con ranibizumab intravítreo.....	152
6.2.2.1. Análisis del polimorfismo <i>RAD51B</i> (rs8017304) según modelo codominante.....	152
6.2.2.2. Análisis del polimorfismo <i>RAD51B</i> (rs8017304) según modelo dominante.....	153
6.2.2.3. Análisis del polimorfismo <i>RAD51B</i> (rs8017304) según modelo recesivo..	154
6.2.2.4. Análisis del polimorfismo <i>RAD51B</i> (rs8017304) según modelo por alelos.....	155
6.2.3. Influencia del polimorfismo <i>TGFBR1</i> (rs334353) en el tratamiento con ranibizumab intravítreo.....	157
6.2.3.1. Análisis del polimorfismo <i>TGFBR1</i> (rs334353) según modelo dominante.....	157
6.2.3.2. Análisis del polimorfismo <i>TGFBR1</i> (rs334353) según modelo por alelos..	158
6.2.4. Influencia del polimorfismo <i>COL8A1L/FILIP1L</i> (rs13081855) en el tratamiento con ranibizumab intravítreo.....	159
6.2.4.1. Análisis del polimorfismo <i>COL8A1L/FILIP1L</i> (rs13081855) según modelo por alelos.....	159
6.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS RESULTADOS.....	160
6.3.1. Tasa de respuesta a tratamiento a ranibizumab intravítreo en nuestra población.....	160
6.3.2. Número de inyecciones intravítreas en nuestra población.....	160
6.3.3. Factores influyentes en la ganancia de agudeza visual.....	161
6.3.4. Valoración del efecto del tratamiento en las variables de respuesta: agudeza visual y espesor membrana.....	163
CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN.....	167
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES.....	181

CAPÍTULO IX. LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	185
CAPÍTULO X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	189
ANEXOS.....	221

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABCA4: gen de la enfermedad de Stargardt

ADAMTS: *A Disintegrin-like and Metalloproteinase (reprolysin type) with Thrombospondin Type 1 Motifs*, Dominio similar a desintegrina A y metaloproteasa con motivos de Tromboespondina tipo 1.

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFG: angiografía con fluoresceína

Ang 1: angiopoyetina 1

Ang 2: angiopoyetina 2

ApoE: apolipoproteína E

AREDS: *Age-Related Eye Disease Study*

ARMS2: gen de la susceptibilidad a la maculopatía asociada a la edad tipo 2

AV: agudeza visual

BCVA: *best correction visual acuity*. Mejor agudeza visual corregida

CAT: *cube average thinckness*. Espesor medio del cubo

CD: cuenta dedos

CFB: factor B del complemento

CFH: factor H del complemento

CFI: factor I del complemento

CHUC: Complejo Hospitalario Universitario de Cartagena

Cr: cromosoma

CST: *central subfiled thickness*. Espesor central de la retina

CV: *cube volumen*. Volumen del cubo

DM: diabetes mellitus

DMAE: degeneración macular asociada a la edad

DNPs: desoxinucleótidos trifosfatos

DOC1: *down-regulated in ovarian cancer 1*

EA: Enfermedad de Alzheimer

ECV: enfermedad cardiovascular

EPR: epitelio pigmentario de la retina

ETDRS: *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*

Fab: fragmento de anticuerpo monoclonal

FDA: *food and drug administration*

FDG: factor de crecimiento fibroblástico
FGF- β : subunidad beta del factor de crecimiento derivado de fibroblastos
FILIP1L: *filamin A interacting protein 1-like*
FO: fondo de ojo
GWAS: estudios de asociación de genoma completo
HCL: hipercolesterolemia
HIF: factor inductor de hipoxia
HTA: hipertensión arterial
HTRA1: Gen de serin peptidasa 1 de alto requerimiento de temperatura
Ig: inmunoglobulina
kD: kilodalton
LIPC: gen que codifica a la lipasa hepática
MAC: complejo de ataque de membrana
MAE: maculopatía asociada a la edad
MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
mg: miligramos
mm: milímetros
MM: movimiento de manos
mmHg: milímetros de mercurio
MMP: metaloproteasas
NVC: neovascularización coroidea
OCT: tomografía de coherencia óptica
PCR: *polimerasa chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGFR: receptor de factor de crecimiento plaquetario
PEGF: factor de crecimiento epidérmico
PIO: presión intraocular
PL: percibe luz
PIGF: factor de crecimiento placentario
PRN: *pauta pro re nata*
RAP: proliferación angiomasosa retiniana
RCA: región centromérica del clúster
RNA: ácido ribonucleico
SNP: polimorfismo de nucleótido simple

TFD: terapia fotodinámica

TGF- β : factor transformador del crecimiento beta

TGFBR1 receptor tipo 1 del factor de crecimiento transformante beta

TIMP: inhibidor de la metaloproteasa de matriz

UCAM: Universidad Católica de Murcia

VCP: vasculopatía coroidea polipoidea

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

VEGFR: receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del globo ocular.....	40
Figura 2. Capas de la retina y coroides.....	42
Figura 3. Imagen retinoscópica del polo posterior del ojo en relación un esquema de corte sagital de la región foveal.....	44
Figura 4. DMAE seca. Retinografía de un paciente en el que se aprecian drusas y alteración del Epitelio Pigmentario de la Retina.....	48
Figura 5. DMAE exudativa o húmeda. Retinografía de un paciente en el se aprecia lesión quística macular con sangrado acompañante.....	49
Figura 6. Morfología de los desechos drusenoides subretinianos.....	51
Figura 7. Cicatriz disciforme. Retinografía de paciente con atrofia extensa y circular de EPR.....	52
Figura 8. Diagrama que representa las relaciones anatómicas entre el epitelio pigmentario de la retina, la membrana de Bruch y las drusas.....	57
Figura 9. La iniciación de la respuesta inflamatoria en el endotelio vascular retiniano.....	60
Figura 10. Cascada de señalización de VEGF a través de VEGFR2.....	62
Figura 11. Escala ETDRS.....	64
Figura 12. Escala de Snellen.....	65
Figura 13. Rejilla de Amsler.....	66
Figura 14. Secuencia angiográfica de NVC.....	67
Figura 15. Interferometría de baja coherencia. Esquema que muestra el funcionamiento de la OCT.....	70
Figura 16. Imagen de OCT de mácula sana en comparación con retinografía de polo posterior sano.....	71
Figura 17. Tomografía de coherencia óptica donde se observan ondulaciones en la capa de EPR correspondientes a drusas maculares.....	71
Figura 18. Membrana neovascular subretiniana con presencia de líquido subretiniano.....	72
Figura 19. Síntesis de bevacizumab y ranibizumab.....	77
Figura 20. Mecanismo de acción de los fármacos antiVEGF.....	81
Figura 21. Esquema de polimorfismo de nucleótido simple (SNP).....	84
Figura 22. Esquema del sistema de complemento.....	87

Figura 23. Modelo de inflamación de la degeneración macular.....	89
Figura 24. Máscara oclusora con agujero estenoico empleada en la consulta.....	123
Figura 25. Imagen de Cirrus HD-OCT empleada en nuestro estudio.....	125
Figura 26. Diagrama de las 9 regiones del mapa macular EDTRS.....	126
Figura 27. OCT de paciente incluido en el estudio con buena respuesta a tratamiento con ranibizumab intravítreo.....	129
Figura 28. OCT de paciente incluido en el estudio con mala respuesta a tratamiento con ranibizumab intravítreo.....	130
Figura 29. Genotipado de SNPs KASPar con sondas fluorescentes.....	133
Figura 30. Programa de termociclado para el protocolo de 61 a 55°C.....	135
Figura 31. Gráfico de temperatura de termociclado en función del tiempo.....	135
Figura 32. Distribución de genotipos en función de las fluorescencias asociadas a los alelos para el polimorfismo <i>ADAMTS9</i>	136
Figura 33. Gráfico de distribución por sectores de los genotipos en los polimorfismos de los casos a estudio.....	143
Figura 34. Gráfico de distribución por sectores de los genotipos en los polimorfismos en los controles a estudio.....	143
Figura 35. Antecedentes familiares en los polimorfismos.....	147
Figura 36. Número inyecciones según las variantes genéticas polimorfismo <i>RAD51</i>	152
Figura 37. Tasa de respuesta a tratamiento.....	160
Figura 38. Número de inyecciones.....	160
Figura 39. Evolución de la agudeza visual en la población del estudio (media \pm error típico).....	165
Figura 40. Evolución del espesor macular en la población del estudio (media \pm error típico).....	166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de conversión de AV realizada según baremo de la OMS.....	124
Tabla 2. Protocolo de genotipado del ensayo.....	134
Tabla 3. Descriptivo variables demográficas y clínicas.....	141
Tabla 4. Tabla de contingencia de casos frente a controles para <i>ADAMTS9</i>	144
Tabla 5. Tabla de contingencia de casos frente a controles para <i>RAD51B</i>	145
Tabla 6. Tabla de contingencia de casos frente a controles para <i>TGFBR1</i>	146
Tabla 7. Tabla de contingencia de casos frente a controles para <i>COL8A</i>	146
Tabla 8. Análisis polimorfismo <i>ADAMTS9</i> según modelo codominante.....	148
Tabla 9. Análisis polimorfismo <i>ADAMTS9</i> según modelo dominante.....	149
Tabla 10. Análisis polimorfismo <i>ADAMTS9</i> según modelo recesivo.....	150
Tabla 11. Análisis del polimorfismo <i>ADAMTS9</i> según modelo por alelo.....	151
Tabla 12. Análisis polimorfismo <i>RAD51B</i> según modelo codominante.....	153
Tabla 13. Análisis polimorfismo <i>RAD51B</i> según modelo dominante.....	154
Tabla 14. Análisis polimorfismo <i>RAD51B</i> según modelo recesivo.....	155
Tabla 15. Análisis polimorfismo <i>RAD51B</i> según modelo por alelos.....	156
Tabla 16. Análisis polimorfismo <i>TGFBR1</i> según modelo dominante.....	157
Tabla 17. Análisis polimorfismo <i>TGFBR1</i> según modelo por alelos.....	158
Tabla 18. Análisis polimorfismo <i>COL8A</i> según modelo por alelos.....	159
Tabla 19. Efecto de las variables demográficas, clínicas y polimorfismos para la predicción de la ganancia de AV.....	162
Tabla 20. Prueba esfericidad de Mauchly.....	164
Tabla 21. Medias (DT) y contrastes estadísticos en las variables.....	164

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado la autorización para inyección de tratamiento intravítreo.....	223
Anexo 2. Consentimiento de autorización de utilización de datos clínicos y de material biológico excedente del proceso asistencial para investigación biomédica y conservación en biobanco de acuerdo con la Ley de Investigación Biomédica del 4 de julio de 2007.....	224
Anexo 3. Hoja de recogida de datos.....	231

I - INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

1.1. GLOBO OCULAR

1.1.1. Definición

El globo ocular u ojo es el órgano encargado de la visión. A través de él se obtiene información en imágenes del mundo exterior. Mediante un complejo sistema dióptrico formado por estructuras transparentes los rayos de luz penetran en el ojo por la córnea y llegan a la retina, donde las imágenes se transforman en estímulos nerviosos que son procesados posteriormente en el córtex cerebral (1, 2).

1.1.2. Anatomía del globo ocular

El globo ocular es una estructura esférica de unos 23,5 mm de longitud axial formada por tres capas principales (3, 4):

- Capa externa, constituida por la esclera y la córnea, estructuras colágenas muy resistentes encargadas de la esfericidad y la transparencia del globo ocular, respectivamente.
- Capa intermedia, constituida por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides, encargada sobre todo de la vascularización del globo ocular.
- Capa interna, constituida por la retina y responsable de la recepción de las imágenes.

Además, en el interior del ojo se encuentran tres medios ópticos: 1) el humor acuoso, estructura líquida localizada en la cámara anterior ocular, 2) el cristalino, lente fibrosa localizada detrás del iris y 3) el humor vítreo, estructura gelatinosa que rellena la parte posterior del globo ocular y está en contacto con la retina (3, 4) (Fig. 1).

El flujo coroideo es de los mayores flujos sanguíneos del cuerpo, lo que provoca un elevado gradiente de concentración de oxígeno permitiendo la oxigenación y nutrición de las capas más externas de la retina, así como una correcta eliminación de las sustancias de desecho (4).

1.3. RETINA

1.3.1. Definición

La retina es la capa más interna del ojo. Está formada por fibras nerviosas que contienen fotorreceptores y se encarga de transformar los estímulos luminosos en impulsos nerviosos que se transmiten al cerebro a través del nervio óptico (5).

La porción neurosensorial de la retina es una estructura anatómica compleja que comprende diez capas histológicas y contiene 6 millones de conos y 120 millones de bastones (Fig. 2). Los conos participan en la visión de los colores y los bastones participan en la visión escotópica o nocturna (6).

Los fotorreceptores constan de dos segmentos, los segmentos internos y los segmentos externos. Los segmentos internos son muy ricos en mitocondrias, encargadas de suministrar energía a estas células con una alta actividad metabólica (7).

Los segmentos externos almacenan los pigmentos que absorben la luz iniciando el proceso visual mediante sinapsis nerviosa hacia las células del nervio óptico (8).

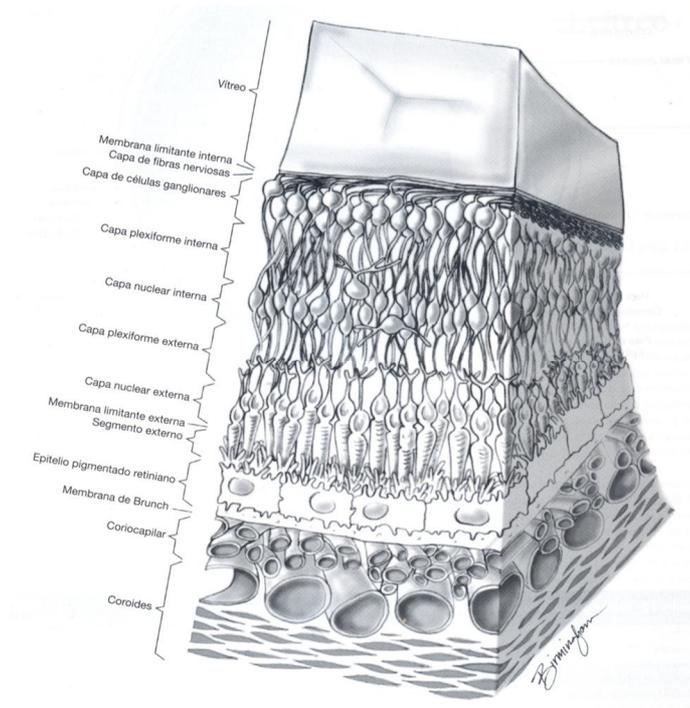


Figura 2. Capas de la retina y coroides (6).

1.3.2. Epitelio pigmentario de la retina

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es la capa más externa de la retina. Separa la coroides de la retina sensorial (3). Entre el EPR y la coroides existe un espacio virtual denominado espacio subretiniano. Las células del EPR y los complejos de unión intercelulares de sus capilares (de tipo zónula ocludens) forman la barrera hematorretiniana que evita la acumulación de líquido procedente de la vascularización coriocapilar en este espacio (9).

El EPR tiene un papel fundamental en la correcta función retiniana: metaboliza la vitamina A, fagocita las porciones renovables de los fotorreceptores y controla el suministro de oxígeno y nutrientes a los fotorreceptores a través de la barrera hematorretiniana (10).

La membrana basal del EPR está en íntimo contacto con una lámina avascular llamada Membrana de Bruch. Los cambios en esta capa desempeñan un papel fundamental en la patología macular (9).

1.3.3. Vascularización retiniana

La arteria central de la retina penetra el globo ocular por su parte posterior junto al nervio óptico, bifurcándose en ramas superior e inferior y posteriormente en ramas nasal y temporal, llegando de este modo a los cuatro cuadrantes retinianos. La arteria central de la retina es la encargada de nutrir la parte interna de la retina (2).

Las células endoteliales de esta arteria presentan en su superficie unas digitaciones denominadas pericitos, separados unos de otros por una red de capilares fenestrados formando así la barrera hematorretiniana interna, que funciona como un filtro de sustancias (4).

1.4. MÁCULA

La mácula lútea es una zona redondeada, de unos 5,5 mm de diámetro, en la porción central de la retina, en la que se agrupa la mayor cantidad de conos (Fig. 3). Su nombre se debe a los pigmentos xantófilos (luteína y zeaxantina) que impregnan las capas de la retina desde la capa nuclear externa hasta el EPR. Estos pigmentos amarillentos absorben las longitudes de onda azules y protegen a la mácula de la formación de radicales libres (11).

En la porción central de la mácula se encuentra la fovea, una depresión retiniana de aproximadamente 1,5 mm de diámetro (4).

Esta característica anatómica junto con la ausencia de vascularización sanguínea en las 400 micras centrales (zona avascular foveal) hacen que se reduzca al mínimo la dispersión de la luz (7).

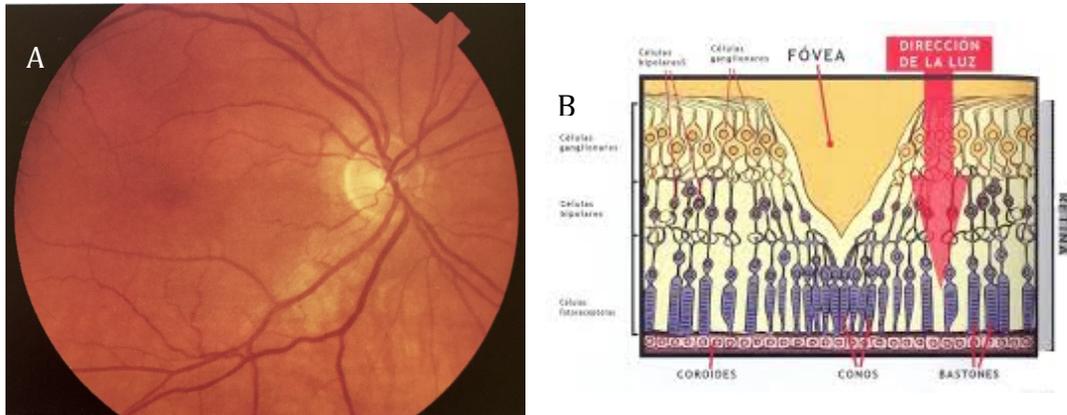


Figura 3. Imagen retinoscópica del polo posterior del ojo (A) en relación con un esquema de corte sagital de la región foveal (B) donde se visualizan las capas de células en la región macular y cómo penetra la luz a través de ellas (2).

1.5. DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD

1.5.1. Definición

La maculopatía asociada a la edad (MAE) es una exacerbación del proceso de envejecimiento fisiológico de la retina caracterizado por la aparición de drusas, manchas amarillentas tenues en la mácula, y/o alteraciones pigmentarias del EPR (7).

La degeneración macular asociada la edad (DMAE) es una enfermedad degenerativa retiniana caracterizada por presentar en estadios iniciales drusas (mayores que en la MAE) y/o alteraciones en el epitelio pigmentario y en fases más avanzadas atrofia geográfica del EPR, desprendimiento del EPR, neovascularización coroidea (NVC) subretiniana y/o tejido cicatricial retiniano (7).

La sintomatología es mayor sobre todo en las fases avanzadas, cursando con pérdida de visión, escotoma central y metamorfopsia (6).

1.5.2. Historia

La degeneración macular senil fue descrita por primera vez por Otto Haab en 1885, describiendo cambios atróficos y pigmentarios en la región macular que provocaban un deterioro progresivo del campo de visión central en personas mayores de 50 años (12).

En los años setenta del siglo pasado, Gass dio un paso hacia un mejor entendimiento de la enfermedad aclarando que las drusas, la degeneración macular senil y la degeneración macular disciforme representaban distintos espectros de una misma patología (13).

En los años noventa se propusieron los términos MAE inicial y avanzada, sugiriendo que la MAE inicial no es un estado patológico y reservando el término DMAE para la MAE avanzada (14).

1.5.3. Prevalencia de la DMAE

La degeneración macular constituye la primera causa de ceguera legal en personas mayores de 65 años en países desarrollados (15). Aunque raras veces conduce a ceguera completa porque respeta la visión periférica, afecta seriamente la autonomía y la calidad de visión de los pacientes.

En España, la prevalencia de la DMAE avanzada varía desde el 0,5% a los 55 años hasta el 7% por encima de los 65 y se esperan unos 25.000 nuevos casos anuales de la forma avanzada (16).

Existen diferentes estudios sobre la prevalencia de la DMAE, la mayoría realizados en Estados Unidos:

- El *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) examinó a 10.000 pacientes entre 1971 y 1973 en 35 centros de Estados Unidos.

Se observó que la prevalencia de DMAE aumentaba por encima de los 64 años. Entre 1988 y 1991 se llevó a cabo una actualización de este estudio que estimó que la prevalencia de DMAE en Estados Unidos era del 9,2% (17).

- En el *Framingham Eye Study* (FES), realizado entre 1973 y 1975, se proporcionaron datos de más de 2.500 personas de entre 52 y 85 años. La prevalencia de DMAE avanzada fue del 1.5% (18).

- En el *Chesapeake Bay Watermen Study* se examinaron a 777 personas del estado de Maryland. La prevalencia de DMAE avanzada (atrofia geográfica y enfermedad neovascular) fue del 1,8% en total, y del 6% en mayores de 70 años (19).

- El *Beaver Dam Eye Study* se realizó durante 1987 y 1988 y examinó a 6.000 personas de entre 43 y 84 años de la población de Beaver Dam (Wisconsin). La prevalencia de DMAE avanzada en total fue del 1,6%, y del 7,1% en las personas mayores de 75 años (20).

- En Europa se publicó en 1995 el *Rotterdam Study*, que incluyó a más de 6.000 personas de 55-98 años de población holandesa. Los resultados de prevalencia de DMAE arrojaron una cifra similar, aunque algo inferior al *Beaver Dam Eye Study* (21).

- En Australia se realizó, también en 1995, el *Blue Mountains Eye Study*, que demostró una prevalencia del 1,9% en la población general y que aumentaba hasta el 18,5% en mayores de 85 años (22).

La mayoría de estos trabajos, cuando hablan de DMAE, se refieren a la presencia de formas neovasculares o formas atróficas avanzadas aunque algunos de ellos consideran como DMAE la simple presencia de drusas.

1.5.4. Clasificación de la DMAE

Hay varios sistemas para clasificar la DMAE, uno de los más usados clásicamente es la Clasificación de Wisconsin (WARMGS) que utiliza una serie de características de las drusas y de otras lesiones relacionadas con la DMAE (23):

- MAE: drusas poco definidas o reticulares en ausencia de signos de DMAE.
- DMAE seca o atrófica: área mayor de 175 micras con aparente ausencia de EPR, permitiendo la visualización de los vasos coroideos.
- DMAE húmeda o neovascular: desprendimiento del EPR asociado a otros signos de DMAE o a NVC (cicatriz, tejido glial, hemorragia, etc.)

Otra clasificación es el Sistema de Clasificación Internacional (24):

- MAE: drusas blandas o confluyentes, de límites definidos o poco definidos, con hiper o hipopigmentación del EPR asociado a drusas.
- DMAE geográfica: zona bien definida, circular u oval, de 175 micras con ausencia de EPR o hipopigmentación.
- DMAE neovascular: desprendimiento del EPR o retina neurosensorial asociada a MAE, NVC, cicatriz, tejido glial, hemorragia, etc.

La última clasificación en uso la publicaron Ferris y colaboradores en 2013 (25). Establece cinco estadios de enfermedad:

- Sin cambios aparentes en el fondo de ojo: no hay evidencia de drusas ni de alteraciones pigmentarias.
- Cambios normales de la edad: sólo se encuentran drusas pequeñas, menores de 63 micras, en el fondo de ojo y no hay alteraciones pigmentarias.
- DMAE precoz: hay drusas de tamaño mediano (entre 63 y 125 micras de diámetro) en el fondo de ojo, sin alteraciones pigmentarias.

- DMAE avanzada: lesiones asociadas a neovascularización retiniana y/o atrofia geográfica. Comprende las dos formas clásicas de clasificación de esta entidad: a) la forma seca o atrófica y b) la forma húmeda o exudativa.
- a) La DMAE atrófica, seca o no exudativa se caracteriza por la aparición de áreas redondeadas con ausencia de EPR (Fig. 4) que pueden evolucionar al estadio final de atrofia geográfica (26).

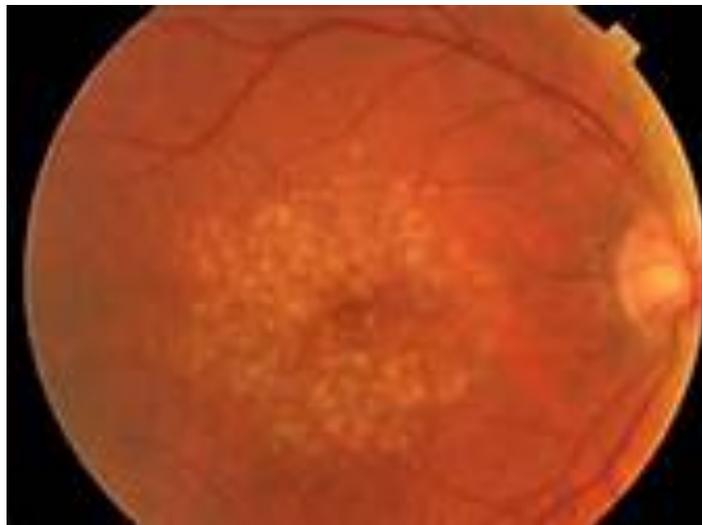


Figura 4. DMAE seca. Retinografía de un paciente en el que se aprecian drusas y alteración del EPR (FOTO DE AUTOR).

- b) La DMAE exudativa o húmeda se caracteriza por la aparición de membranas neovasculares subretinianas o subepiteliales, desprendimiento de EPR, hemorragias subretinianas, cicatrices gliales retinianas, que se pueden asociar a depósitos de fibrina, y exudación lipídica (6) (Fig. 5).



Figura 5. DMAE exudativa o húmeda. Retinografía de un paciente en el que se aprecia lesión quística macular con sangrado acompañante (FOTO DE AUTOR).

Además se pueden incluir otras dos entidades dentro del concepto de DMAE neovascular avanzada: la Proliferación Angiomatosa Retiniana (*Retinal Angiomatous Proliferation*, RAP) en la que la estructura neovascular tiene un marcado componente intrarretiniano inicialmente (27) y la Vasculopatía Coroidea Polipoidea (VCP) en la que aparece una red anómala en la circulación coroidea, terminada en unas dilataciones saculares a modo de pólipos (28).

1.5.5. Histología y signos clínicos de DMAE

La lipofuscina es un pigmento autofluorescente que se acumula en las células pigmentarias de la retina. Cuando una célula pigmentaria muere es fagocitada por las células pigmentarias vecinas. En la DMAE hay un aumento no controlado de la muerte celular, de modo que las células se van llenando de lipofuscina, desestructurándose y perdiendo su capacidad de fagocitosis.

Así, las células que permanecen van aumentando su tamaño y relleno los huecos que las células muertas van dejando.

Debido a este daño celular se producen cambios como disminución en el número de fotorreceptores, engrosamiento de la membrana de Bruch y activación la vascularización coroidea (29, 30).

1.5.5.1. *Drusas*

Las drusas son depósitos residuales de material extracelular de color amarillento que se sitúan en el espacio subretiniano entre la membrana basal de las células del EPR y la zona colágena interna de la membrana de Bruch. Son el signo típico y patognomónico de la DMAE (Fig. 6) (27).

Pueden variar en número, tamaño, forma, grado de elevación y extensión en el EPR. Se localizan confinadas dentro de la fovea o alrededor de ella respetándola. Raramente aparecen antes de los 45 años, pero son casi universales en personas mayores de 65 años (31).

Según su histología y su morfología se pueden clasificar en (32):

- Drusas pequeñas y duras, típicas de las formas secas de DMAE.
- Drusas blandas granulares, semisólidas con desprendimiento localizado del epitelio basal.
- Drusas blandas líquidas con desprendimientos drusenoides del EPR.
- Drusas blandas o membranosas.
- Drusas reticulares o pseudodrusas reticulares.
- Drusas en regresión.

Todas las formas de drusas blandas son típicas de las formas húmedas (33).

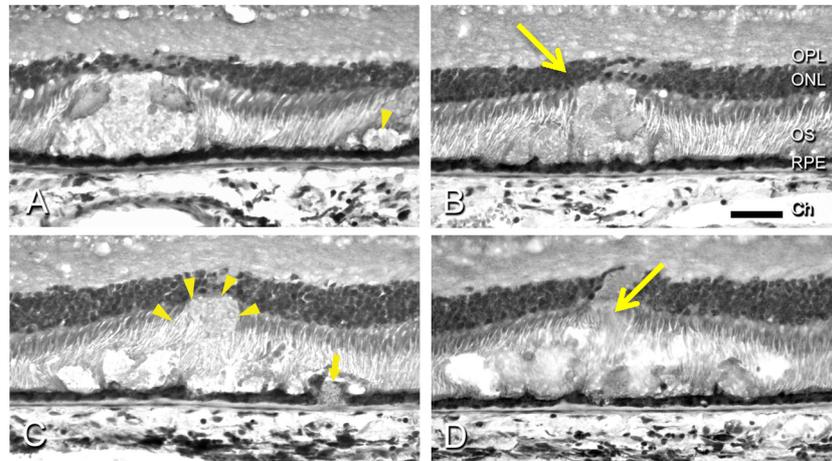


Figura 6. Morfología de los desechos drusenoides subretinianos. En A, las lesiones (punta de flecha) se encuentran normalmente en el espacio subretiniano intercaladas entre el sistema operativo de los fotorreceptores y RPE (*retinal pigment epithelium*, epitelio pigmentario de la retina). En B, las lesiones penetran el espacio intrarretiniano. OPL (*outer plexiform layer*, capa plexiforme externa), ONL (*outer nuclear layer*, capa nuclear externa), OS (*outer segments of rods and cones*, capa de segmentos de bastones y conos), Ch (*Choroides*, coroides) En C, las puntas de flecha delimitan el borde exterior de la lesión, y la flecha indica una pequeña drusa. C y D son secciones en serie que demuestran la progresión de los desechos a través de los fotorreceptores (29).

1.5.5.2. Atrofia incipiente (atrofia no geográfica)

Es la fase en que se produce un adelgazamiento y despigmentación del EPR. A nivel histológico se observa un infiltrado de linfocitos, fibroblastos y macrófagos en la membrana de Bruch (30). Precede a la atrofia geográfica.

1.5.5.3. Atrofia geográfica

Se define como cualquier zona ovalada o redondeada bien delimitada, hipopigmentada, despigmentada o con ausencia aparente del EPR, en la que los vasos corioideos son más visibles que en las zonas circundantes y que debe ser al menos de 175 micras de diámetro.

La muerte del epitelio pigmentario precede a la atrofia de la capa coriorretiniana y a la vasoconstricción de la capa coriocapilar, presumiblemente

por la disminución de la producción de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (26).

1.5.5.4. Neovascularización coroidea

La DMAE exudativa se caracteriza por la existencia de una NVC en el área macular generada por un proceso de formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos a través de la gemación o separación de los vasos coroideos existentes en condiciones normales (Fig. 7A). Estos neovasos procedentes de la capa coriocapilar penetran a través de la membrana de Bruch en el espacio que está por debajo del epitelio pigmentario, pudiendo desarrollarse también en el espacio subretiniano. Progresivamente se asocian a una proliferación fibrovascular produciendo en estadios finales una cicatriz disciforme (Fig. 7B), con destrucción del EPR y de los fotorreceptores de la retina (26).

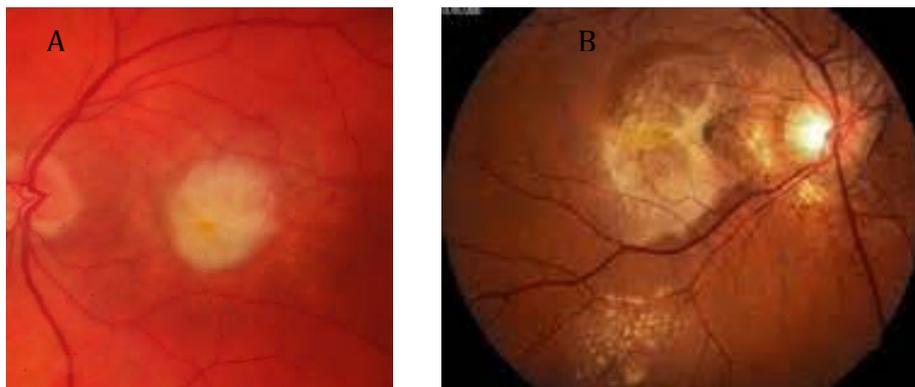


Figura 7. A) Retinografía de paciente con DMAE exudativa con NVC. B) Cicatriz disciforme. Retinografía de paciente con atrofia extensa y circular de EPR. (FOTOS DE AUTOR)

1.5.6. Factores de riesgo de DMAE

Los factores de riesgo que pueden afectar a la aparición de la DMAE se pueden dividir en demográficos, cardiovasculares, tóxico-nutricionales, oculares, hormonales o asociados a enfermedades como es la Enfermedad de Alzheimer.

1.5.6.1. Factores demográficos

1.5.6.1.1. Edad

La edad es el principal factor de riesgo para presentar DMAE. Todos los estudios epidemiológicos revisados demuestran un claro incremento de la prevalencia de la DMAE conforme aumenta la edad (14-19).

1.5.6.1.2. Sexo

La DMAE parece ser más frecuente en el sexo femenino, pero no está claramente demostrado (14-19).

1.5.6.1.3. Raza

Las formas más avanzadas de DMAE parecen ser menos frecuentes en la raza negra, lo que se explicaría por el papel protector de la melanina frente a los procesos oxidativos retinianos, aunque no está científicamente demostrado (35).

1.5.6.2. Factores cardiovasculares

1.5.6.2.1. Arteriosclerosis

Se ha encontrado mayor prevalencia de DMAE en personas con placas ateromatosas carotídeas. Hay estudios que postulan que la DMAE neovascular podría ser fruto de un proceso de arteriosclerosis que afectase a los vasos coroideos (36).

1.5.6.2.2. Hipertensión arterial

La posible relación entre DMAE e hipertensión arterial (HTA) no se ha podido confirmar aunque hay estudios que concluyen que la HTA es un factor de riesgo de padecer DMAE (37).

1.5.6.2.3. Hipercolesteremia

Los niveles altos de colesterol en sangre o hipercolesterolemia (HCL) parecen predisponer a desarrollar DMAE, pero los resultados no son lo suficientemente concluyentes (37).

1.5.6.2.4. Diabetes mellitus

La posible relación entre diabetes mellitus (DM) y DMAE tampoco se ha podido evidenciar. Hay que tener en cuenta que en presencia de retinopatía diabética es complicado diagnosticar una DMAE por la similitud de signos clínicos que comparten (37).

1.5.6.3. Factores tóxicos y nutricionales

1.5.6.3.1. Tabaco

Junto con la edad, el tabaquismo es el único factor de riesgo de DMAE claramente demostrado. Es un factor dosis-dependiente, ya que a mayor número de cigarrillos fumados por día mayor es el riesgo de desarrollar DMAE. Este riesgo se mantiene años después de dejar de fumar. Esta asociación vendría determinada por el aumento del estrés oxidativo que provoca el consumo de tabaco (38).

1.5.6.3.2. Alcohol

No se han encontrado datos relevantes que relacionen la DMAE con la ingesta de alcohol, aunque recientemente se han publicado estudios que indican el factor protector del resveratrol, presente en el vino, en el desarrollo de esta enfermedad (39).

1.5.6.3.3. Antioxidantes

Se han llevado a cabo varios estudios para determinar si la ingesta de antioxidantes puede prevenir el desarrollo de esta enfermedad, debido a la importancia que tiene el estrés oxidativo en la patogénesis de la DMAE. El más significativo es el estudio AREDS (*Age-Related Eye Disease Study*), que aleatorizó a pacientes con distintos grados de DMAE a suplementación oral con antioxidantes, zinc, antioxidantes y zinc, todos ellos *versus* placebo. Como antioxidantes se utilizaron vitamina C, vitamina E y betacarotenos. La media de seguimiento fue de 6,3 años. Los resultados del estudio demostraron que la combinación de antioxidantes y zinc era efectiva para reducir la progresión en pacientes con mayor riesgo de desarrollar formas avanzadas de DMAE (40).

Paradójicamente, en este estudio se observó que los betacarotenos se relacionaban con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en personas fumadoras. Por este motivo, se realizó el estudio AREDS 2, reemplazando a los betacarotenos como antioxidantes por luteína y zeaxantina y/o ácido graso de cadena larga poliinsaturado omega 3. Además se disminuyó la dosis de zinc por recomendación de nutricionistas del estudio AREDS encontrándose igualmente reducción en la progresión de enfermedad (41).

1.5.6.3.4. Exposición solar

La luz interacciona con las moléculas de la retina e induce la formación de radicales libres causando peroxidación lipídica en la capa retiniana formada por los segmentos de externos de los fotorreceptores.

Se ha demostrado una relación entre la exposición solar y la aparición de drusas y alteraciones en el EPR (42), aunque no es un factor directo como la edad y el hábito tabáquico. Sui y colaboradores publicaron en 2013 un metaanálisis que confirma esta relación (43).

Por otra parte, el cristalino opaco (denominado catarata), al localizarse por detrás del iris y delante de la retina, puede hacer de filtro de la radiación ultravioleta evitando el inicio de lesiones degenerativas en la retina (44).

1.5.6.4. Factores oculares

1.5.6.4.1. Hipermetropía

Hay estudios que sugieren que la DMAE es más frecuente en personas hipermétropes. Posiblemente, la menor longitud axial ocular de estos pacientes puede comprometer el flujo sanguíneo de los vasos coroides favoreciendo el desarrollo de DMAE (37).

1.5.6.4.2. Color del iris

La melanina protege a la retina del daño oxidativo causado por la radiación solar ya que puede neutralizar radicales libres. Los iris claros, que tienen menos melanina, se consideran un factor de riesgo de DMAE (37).

1.5.6.4.3. Cirugía de catarata

La cirugía de catarata puede favorecer el desarrollo de DMAE en ojos predispuestos, al quitar la protección del cristalino. Además, durante la cirugía se liberan factores proinflamatorios que pueden influir en la progresión de la DMAE (44).

1.5.6.5. Factores hormonales

Las mujeres con menopausia precoz tienen mayor riesgo de desarrollar DMAE. Por el contrario, las mujeres postmenopáusicas que toman estrógenos tienen menor prevalencia de DMAE. Aunque se desconoce el por qué, esto sugiere el posible factor protector de los estrógenos frente al desarrollo de DMAE y podría relacionarse con la mayor prevalencia en estadios seniles en el sexo femenino (45).

1.5.6.6. Enfermedad de Alzheimer

Los acúmulos proteicos asociados a las drusas han sido identificados como responsables en la patogenia de otras entidades clínicas como son la enfermedad de Alzheimer (EA), la arteriosclerosis y la amiloidosis. Johnson y colaboradores establecen la relación entre la EA y la DMAE. Estos autores sugieren que las drusas contienen moléculas inmunomoduladoras que provocan inflamación local y activan la cascada del complemento, causando finalmente la degeneración de los fotorreceptores. Postulan, también, que esta inflamación crónica es el punto clave en la patogénesis de la DMAE. La proteína β -amiloide (típicamente presente en la EA) se ha encontrado dentro del componente vesicular de las drusas y se ha implicado como un activador principal de este proceso inflamatorio (Fig. 8) (46).

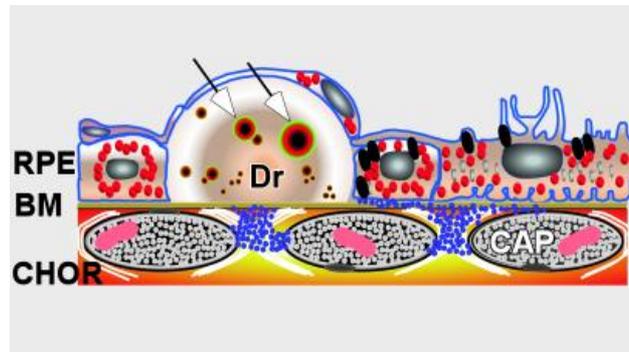


Figura 8. Diagrama que representa las relaciones anatómicas entre el EPR (RPE), la membrana de Bruch (BM) y las drusas (Dr). Las vesículas que contienen β -amiloide, que probablemente representan los sitios principales de la activación del complemento, se identifican dentro de drusas (flechas). CHOR, vasculatura coroidea; CAP, capilares (46).

Anderson y colaboradores demuestran que la herencia de la apolipoproteína E4 va unida tanto a la EA como a la DMAE. Establecen, además, una relación protectora de la apolipoproteína E4 para la DMAE exudativa, pero de riesgo para la EA. Los resultados de sus estudios sugieren que los depósitos celulares derivados de las células del EPR, depositados entre la lámina basal y la membrana de Bruch, contribuyen al estímulo inflamatorio crónico y a una posterior formación de drusas (47).

1.5.7. Etiopatogenia de la DMAE

La DMAE es una enfermedad en la que influyen varios factores causales, aunque todavía no se ha podido demostrar el mecanismo etiopatogénico inicial.

1.5.7.1. Papel del estrés oxidativo

El estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patogenia de la DMAE y se considera su principal factor desencadenante. Ocurre cuando aumentan los niveles de oxidantes sobre los de antioxidantes favoreciendo la oxidación y la pérdida de la adecuada función celular (48).

Como consecuencia de este estrés oxidativo se generan radicales libres de oxígeno en el tejido retiniano cuya producción es elevada debido al exacerbado

metabolismo y consumo de oxígeno de las células del EPR. La producción de sustancias oxidantes se favorece en presencia de factores como la contaminación, la irradiación, la inflamación crónica y el envejecimiento (49).

Las células del EPR y los fotorreceptores son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (docosaheptaenoico y eicosaenoico), muy susceptibles a los radicales libres de oxígeno producidos por la radiación ultravioleta y las elevadas concentraciones de oxígeno. Se han encontrado marcadores de daño celular, además de alteraciones estructurales, en las mitocondrias de las células del EPR y de los fotorreceptores en ojos de donantes con DMAE (50). Esto podría indicar que las alteraciones en la regulación del daño oxidativo y el daño mitocondrial constituyen posibles factores etiopatogénicos de la DMAE (51).

Se ha postulado también el efecto dañino de la luz ultravioleta sobre la retina, incrementando el estrés oxidativo (52). Esta teoría, expuesta por un estudio realizado con la cohorte del *Beaver Dam Eye Study*, sugiere que en el propio metabolismo de degradación de los fotorreceptores retinianos y de sus pigmentos internos (lipofuscina y rodopsina) se generan radicales libres (42), lo que conlleva un aumento de factores proinflamatorios y proangiogénicos y que se desencadene la cascada angiogénica (53).

1.5.7.2. Papel de la angiogénesis

Para la aparición de la angiogénesis se precisa un desequilibrio a favor de la señal proangiogénica, ya sea por aumento de los factores proangiogénicos o por disminución de los antiangiogénicos (52).

La angiogénesis desempeña un papel fundamental en multitud de procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas o la regeneración cardíaca tras un infarto de miocardio. En estos casos, la formación de nuevos vasos es un proceso controlado que permite la ramificación normal de la vasculatura existente.

En otros casos, como en el cáncer o la DMAE, la angiogénesis descontrolada produce un aumento anormal y desordenado de neovasos (54), debido a un incremento del factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial*

Growth Factor, VEGF) y de otros factores proangiogénicos como la subunidad beta del factor de crecimiento derivado de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor Beta*, FGF- β), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*Platelet Derivated Growth Factor*, PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (*Precursor Epidermal Growth Factor*, PEGF), el factor inductor de hipoxia (*Hypoxia Inductor Factor*, HIF) o la angiopoyetina (55).

Las células endoteliales de los vasos coroideos son resistentes a los estímulos angiogénicos en condiciones normales, pero en la DMAE se asocian situaciones patológicas como la hipoxia, la isquemia o la inflamación local crónica que inclinan la balanza hacia la señal proangiogénica. En el caso de que existan alteraciones previas como engrosamiento o disrupción de la membrana de Bruch, presencia de drusas blandas confluentes o disfunción del EPR se genera un ambiente que facilita la angiogénesis y, con ello, la neovascularización coroidea (56).

1.5.7.3. *Papel del EPR y de la inflamación crónica*

El punto principal para el desarrollo de la NVC es la alteración de la función normal de las células del EPR. En condiciones normales, las células del EPR son las responsables del adecuado funcionamiento de los fotorreceptores, de la protección retiniana frente a la luz ultravioleta, de la formación junto con el endotelio vascular de la barrera hematorretiniana y de mantener la inmunidad celular de la mácula (44). Otra de sus principales funciones es la digestión de porciones inútiles de los fotorreceptores retinianos vecinos (5).

El EPR ejerce una importante función en la patogénesis de la DMAE (58). Con la edad, se producen alteraciones en el sistema inmunitario que ocasionan anomalías en la actividad fagocitaria y en el metabolismo de las células del EPR, no pudiendo eliminar correctamente las sustancias de desecho.

Así, se acumula lipofuscina en los lisosomas intracelulares provocando apoptosis de las células del EPR ya que dicho metabolito absorbe la luz, daña el EPR y activa la fagocitosis. Los productos desechados en la fotooxidación de la lipofuscina activan la respuesta del complemento y cronifican la inflamación local (59).

Por otra parte, esta inflamación local está asociada a la angiogénesis en la DMAE exudativa. En el proceso inflamatorio, mediado por macrófagos, se segregan metaloproteasas (MMP), enzimas proteolíticas de la matriz celular que erosionan la membrana de Bruch y activan elementos proinflamatorios como son factores del complemento (C3a y C5a) y citocinas tipo interleucinas-6, 8 y 12. Además, la inflamación local activa las células endoteliales y, con ello, la adhesión y la permeabilidad vascular (Fig. 9) (60).

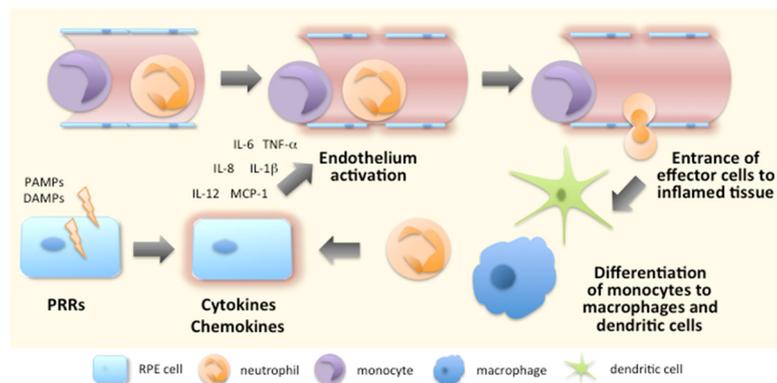


Figura 9. La iniciación de la respuesta inflamatoria en el endotelio vascular retiniano. Reconocimiento de PAMPs y DAMPs (*patogen- and damage- associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a daño y a patógenos) por los receptores de reconocimiento de patógenos celulares (*pathogen recognition receptors*, PPRs) que hacen que aumente la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas. Los mediadores liberados contribuyen a la activación del endotelio, produciendo aumento de la expresión de moléculas de adhesión y de la permeabilización vascular. Los leucocitos circulantes se adhieren a moléculas expresadas por el endotelio, ralentizan su velocidad y comienzan a rodar a lo largo de la capa endotelial.

El gradiente de quimioquinas que se origina en el tejido inflamado hace que los leucocitos comiencen a expresar integrinas para permitir su unión a células endoteliales. Finalmente, los leucocitos abandonan la circulación para buscar el tejido inflamado donde los monocitos se diferencian en macrófagos y células dendríticas según las condiciones locales (60).

1.5.7.4. Papel del factor de crecimiento vascular endotelial

El VEGF fue purificado y clonado por primera vez por Ferrara y colaboradores en 1989 tras aislar un mitógeno endotelial celular en el sobrenadante de células hipofisarias bovinas (61), aunque en estudios previos ya se había descrito una proteína que parecía aumentar la permeabilidad vascular (62).

La familia del VEGF consta de 5 glicoproteínas: VEGF-A, -B, -C, -D y factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor*, PIGF) (63). El VEGF-A es una glicoproteína homodimérica que desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la DMAE exudativa y de otros procesos angioproliferativos retinianos como la retinopatía diabética o la retinopatía del prematuro. Es el responsable de incrementar la permeabilidad vascular de las células endoteliales al liberar MMP que degradan la membrana basal de la células endoteliales haciendo que se extravasen leucocitos, activando la respuesta inflamatoria y la proliferación celular (64, 65).

Se han descrito seis isoformas de VEGF-A que se distinguen por su peso molecular, acidez y capacidad de unión a heparina. Las isoformas se producen por escisión y unión (*splicing*) del ARN. Las formas más pequeñas (isoformas 110, 121, 144 y 165) se segregan y difunden libremente, aunque la isoforma 165 se puede unir a la superficie celular o a la matriz extracelular, mientras que las formas más grandes (isoformas 189 y 206) están unidas a la matriz extracelular y tienen gran afinidad por la heparina (66). Las isoformas extracelulares pueden degradar a la isoforma 110 de VEGF por la proteólisis del plasminógeno sobre la isoforma 165 en la superficie celular siendo esta última funcionalmente activa (67).

La hipoxia tisular es el más potente estimulador de la producción de VEGF-A por las células endoteliales y del EPR (58). A su vez, el VEGF-A es un potente estimulador de la angiogénesis e inductor del incremento de la permeabilidad vascular (68), hasta 50.000 veces más potente que la histamina en el aumento de la permeabilidad microvascular cutánea (69).

El VEGF-A se une a tres receptores tirosincinasa: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. Los receptores tirosincinasas son receptores celulares que presentan

actividad enzimática intrínseca, se unen a ligandos tipo factores tróficos y van asociados a una vía de señalización intracelular. De este modo, su activación tras unión a un ligando externo provoca una cascada interna de reacciones enzimáticas que facilita la adaptación de la célula a su entorno gracias a mensajeros secundarios (Fig. 10) (58, 70). El VEGFR1 participa en la liberación de factores de crecimiento o reclutamiento de células inflamatorias. El VEGFR2 es más activo en las células endoteliales, ya que media propiamente la migración celular y la permeabilidad vascular. La fijación de la forma de VEGF-A 165 en la DMAE a VEGFR2 implica el aumento de la migración celular y la proliferación de las células endoteliales alterando las uniones intercelulares herméticas, lo que provoca un aumento de la permeabilidad y de la proliferación vascular (71).

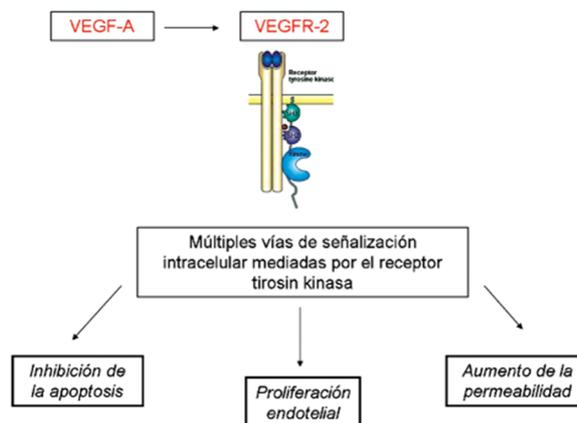


Figura 10. Cascada de señalización de VEGF a través de VEGFR2 (70).

1.5.7.5. Papel del factor de crecimiento derivado de plaquetas

El PDGF está producido por varias células, principalmente por las plaquetas, y estabiliza y madura los neovasos por su acción sobre el pericito, ya que recluta macrófagos y fibroblastos contribuyendo a la fibrosis de los tejidos (72).

El PDGF, al igual que el VEGF, se une a un receptor tirosincinasa, bloqueando al VEGF, por lo que parece ser un factor diana en la inhibición de la angiogénesis (73).

1.5.7.6. Otros factores

Las angiopoyetinas 1 y 2 (Ang 1 y Ang 2) y su receptor Tie-2 contribuyen, junto con el VEGF, a la neovascularización coroidea. La Ang 1 promueve la integridad vascular y la maduración, inhibiendo la apoptosis y reduciendo la permeabilidad celular. La Ang 2 es un antagonista de Ang 1 y promueve la angiogénesis, inducida por VEGF (74).

Hay receptores endoteliales en las membranas celulares de la NVC, como son las α -integrinas y el receptor CD105 del factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor*, TGF- β) que podrían ser dianas para posibles tratamientos antiangiogénicos. En un modelo de NVC se consiguió inhibir la proliferación vascular añadiendo anticuerpos monoclonales contra las α -integrinas (75). Además, el bloqueo del receptor CD105 de TGF- β se ha asociado a la inhibición de la proliferación vascular (76).

Se cree que la naturaleza avascular de la membrana de Bruch se debe a que el EPR inhibe el crecimiento de los vasos sanguíneos coroideos hacia el interior retiniano en condiciones normales, variando esta inhibición con los cambios maculares asociados a la edad. El estímulo que activa la producción del factor de crecimiento del EPR es desconocido, aunque se postula un déficit en el aporte metabólico desde el plasma sanguíneo debido a una menor difusión de sustancias a través de la membrana de Bruch dañada o a la hipoxia resultante de los cambios en los capilares coroideos (77).

1.5.8. Diagnóstico de la DMAE

1.5.8.1. Medida de agudeza visual

En pacientes de edad avanzada es necesario descartar la aparición de DMAE si se detecta una pérdida brusca de agudeza visual (AV) en visión cercana o lejana.

Estos pacientes a menudo refieren una pérdida de visión brusca o la aparición de una mancha oscura en el centro de su campo visual, denominada “escotoma central” cuando aparece una membrana neovascular. La presencia de estos síntomas, en ocasiones, ocurre en uno de los ojos, de modo que puede pasar

desapercibido para el paciente y de ahí la importancia de realizar revisiones oftalmológicas periódicas en los grupos de riesgo de padecer esta enfermedad.

La mayoría de estudios de patología macular emplean la escala ETDRS (*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*) para medir la AV. Consiste en una secuencia de filas de letras dispuestas de mayor a menor tamaño y colocadas en forma triangular (Fig. 11). Parece ser la escala más fiable para cuantificar pérdidas o ganancias de visión en este tipo de pacientes (78).



Figura 11. Escala ETDRS (78) .

Otro tipo de medida de AV es la escala de Snellen. Este método es el más utilizado en las consultas de oftalmología. La escala de Snellen se describe como la distancia a la que se realiza la prueba dividida por la distancia a la cual la letra equivale verticalmente a cinco minutos de arco de tamaño (Fig. 12) (9). Un minuto de arco, denominado también minuto sexagesimal, es una unidad de medida de un ángulo plano que equivale a 1/60 de un grado sexagesimal. Un grado se define como la medida equivalente a 1/360 de un círculo. Son medidas empleadas habitualmente en optometría (79).



Figura 12. Escala de Snellen (9).

1.5.8.2. Test de la rejilla de Amsler

En numerosas ocasiones, la pérdida de AV va asociada a una alteración de la visión denominada metamorfopsia, que consiste en ver distorsionadas las líneas rectas. Para evaluar la presencia de este síntoma se utiliza la rejilla de Amsler, un gráfico con una cuadrícula simple de 400 pequeños cuadrados en fondo negro que permite evaluar 20° de campo visual de fijación central (Fig. 13). Está considerada como la prueba de cribado de patología macular ya que permite valorar si existe dicha metamorfopsia o un escotoma o pérdida de visión central (80).

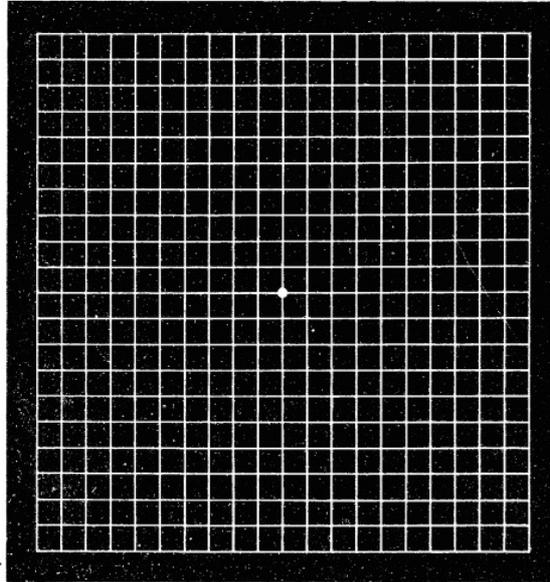


Figura 13. Rejilla de Amsler (78).

1.5.8.3. Examen de fondo de ojo

Hay diferentes herramientas utilizadas por los oftalmólogos para el examen de fondo de ojo (FO) en pacientes con sospecha de DMAE. La más usada es el oftalmoscopio indirecto, que dispone de una fuente de luz y diferentes lentes de aumento que permite la visualización retiniana a través de los medios transparentes del globo ocular. El mismo mecanismo se utiliza también para la lámpara de hendidura o el biomicroscopio ocular.

También se utiliza la retinografía que permite realizar fotografías de polo posterior, que en muchas ocasiones permite hacer la exploración macular sin necesidad de dilatar la pupila (9).

1.5.8.4. Angiografía con fluoresceína

La fluoresceína es un pigmento naranja, soluble en agua, que se inyecta vía endovenosa y circula por el torrente sanguíneo. De este modo, la angiografía con fluoresceína (AFG) consiste en hacer un seguimiento fotográfico del paso de la fluoresceína por la circulación retiniana (Fig. 14). El comportamiento típico de la DMAE es la hiperfluorescencia de las lesiones en la fase precoz. Posteriormente, en

fases tardías, va disminuyendo en intensidad sin cambio en el tamaño o en la forma de las mismas. En el caso de la NVC hay una extravasación de contraste debido a la ruptura de la barrera hematorretiniana interna (9).

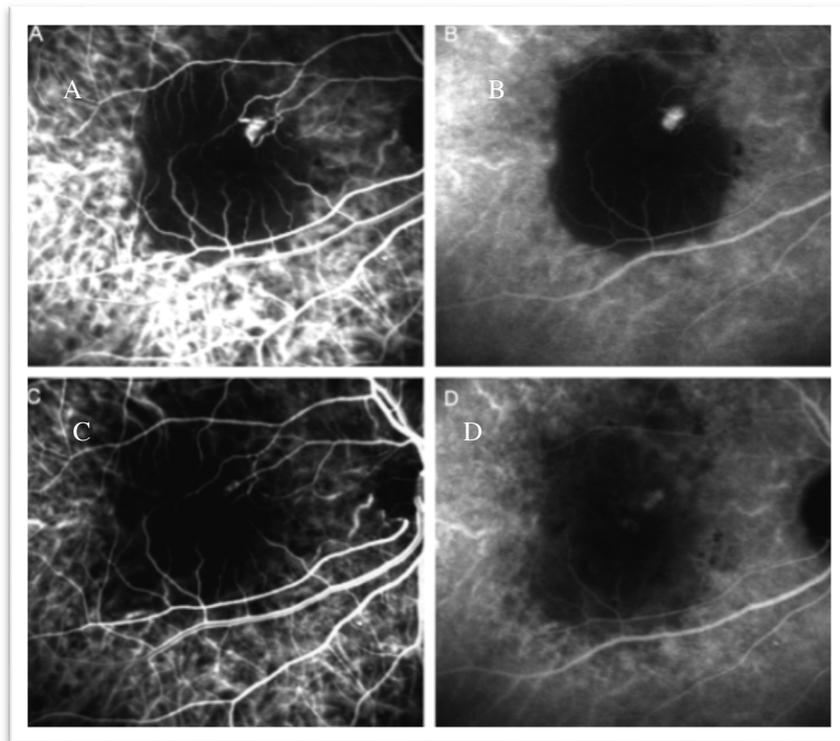


Figura 14. Secuencia angiográfica de NVC en la que existe una hiperfluorescencia en las fases precoces (A y B) y disminución de intensidad en las fases tardía (C y D) (FOTO DE AUTOR)

Angiográficamente hay cuatro tipos de comportamiento de las membranas neovasculares (6):

- Membrana coroidea clásica: Se observa un área de hiperfluorescencia bien delimitada en la fase inicial, con escape tardío de contraste.
- Membrana predominantemente clásica: Cuando la membrana ocupa más del 50% de la lesión.
- Membrana mínimamente clásica: Cuando la membrana ocupa menos del 50% de la lesión.

- Membranas ocultas: Cuando no se evidencia su origen a nivel retiniano. Puede haber hiperfluorescencia irregular en las fases iniciales y un escape de fluoresceína en las fases tardías que podría estar asociado con el desprendimiento de epitelio pigmentario.

La clasificación de las membranas neovasculares según su comportamiento angiográfico tuvo una gran importancia en el pasado porque los resultados del tratamiento, tanto con láser térmico como con terapia fotodinámica, eran diferentes según los distintos tipos de membranas (81). Hoy día, existen tratamientos farmacológicos antiangiogénicos que permiten mejorar la agudeza visual en un tercio de los pacientes con DMAE exudativa, independientemente del tipo de membrana que exista (82). Tampoco es imprescindible la angiografía para valorar la respuesta al tratamiento porque, generalmente, los criterios de retratamiento se basan en la agudeza visual, los hallazgos en la tomografía de coherencia óptica (*Optical coherence tomography*, OCT) y en la exploración con biomicroscopía del fondo de ojo. Actualmente se utilizan técnicas diagnósticas que combinan la angiografía con la OCT (angiotomografía de coherencia óptica) permitiendo un óptimo manejo de la DMAE (83).

No obstante, es aconsejable realizar una angiografía con fluoresceína, como mínimo, en el momento del diagnóstico, ya que sirve como dato pronóstico (son más agresivas las membranas clásicas que las ocultas). Además, se puede retrasar el tratamiento de una membrana oculta sin signos de actividad (pérdida de agudeza visual o sangrado) pero no el tratamiento de una membrana clásica, por el mayor riesgo de progresión y pérdida visual (84).

1.5.8.5. *Angiografía con verde de indocianina*

El verde de indocianina es un colorante soluble en agua, que, al igual que la fluoresceína, se inyecta vía endovenosa y circula por el corriente sanguíneo. La angiografía con verde de indocianina tiene un gran valor para el estudio de la circulación coroidea, mientras que la AFG sólo permite estudio de la circulación retiniana.

Este tipo de angiografía se utiliza en el estudio de las membranas neovasculares ocultas, en neovascularizaciones coroideas asociadas a desprendimiento de neuroepitelio con sangrado subretiniano y en recurrencias de membranas en las que la atrofia retiniana no permite una adecuada visualización de nuevas lesiones (85). Es también útil para la identificación de los patrones característicos de RAP y de VCP (2).

1.5.8.6. Tomografía de coherencia óptica

La OCT fue desarrollada por Huang y Swanson en 1991 (86). Es la prueba diagnóstica por excelencia para el estudio de la DMAE exudativa ya que permite un análisis cuantitativo de los signos de actividad y de la respuesta al tratamiento. Además, es una prueba rápida y no invasiva, a diferencia de la AFG o la angiografía con verde de indocianina. Es de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad así como para valorar la evolución de la respuesta al tratamiento, especialmente tras la administración de inyecciones intravítreas de antiangiogénicos (84).

La OCT proporciona imágenes transversales de alta resolución de vítreo, retina y coroides permitiendo diferenciar estructuras de hasta 10-20 micras. Su funcionamiento es similar a una ecografía pero usa ondas de luz en lugar de ultrasonidos. Las técnicas ópticas de imagen se basan en la utilización de la luz, lo que permite obtener una resolución de las imágenes diez veces superior a las ecográficas. La limitación de estas técnicas es que precisan de una estructura no opaca para permitir el acceso a la luz, por lo que el sistema óptico ocular es un medio ideal para este tipo de exploraciones (87).

El principio básico en que se fundamenta la OCT es la interferometría de baja coherencia, que es un método simple para medir distancias de elevada precisión en función de la luz reflejada desde los tejidos (Fig. 15).

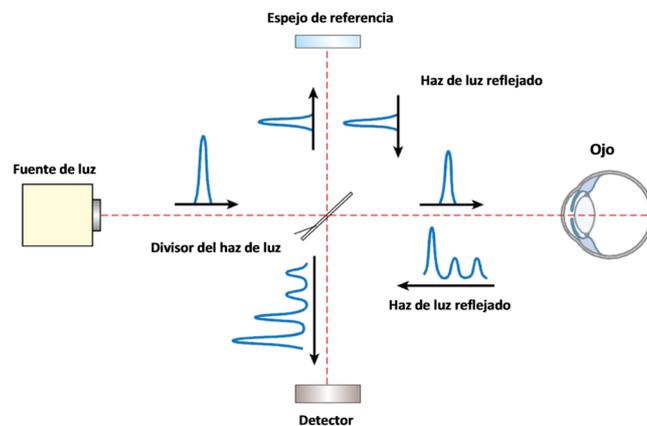


Figura 15. Interferometría de baja coherencia. Esquema que muestra el funcionamiento de la OCT (87).

Consiste en que un rayo de luz infrarroja es emitido desde una fuente de luz monocromática hacia un espejo de referencia situado a una distancia conocida, donde se refleja y se divide en rayo de referencia y rayo de exploración. El rayo de exploración se dirige al ojo penetrando en la retina y dispersándose por sus distintas capas. De este modo, cuanto más alejada está la interfase más retraso llevará la luz reflejada. La luz reflejada de regreso consiste en los múltiples ecos provocados por las diferencias entre la distancia y las características de las estructuras oculares. El interferómetro es el encargado de procesar los rayos de referencia y de señal y de comparar la diferencia de tiempo entre ambos haces de luz reflejados. Estos rayos se recombinan y el resultante se emite a un fotodetector donde se procesa y se digitaliza mediante una computadora. Las imágenes transversales se generan por barrido del rayo óptico en dirección transversal, lo que ofrece una serie de datos en dos dimensiones que se pueden mostrar en una imagen con colores o en escala de grises. El color manifiesta las propiedades ópticas de los tejidos tratándose de imágenes de cortes de tejidos no reales pero que representa las dimensiones verdaderas de los tejidos medidos (86) (Fig. 16).

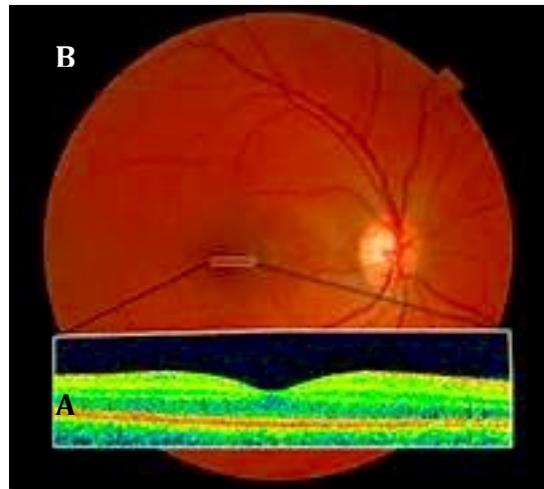


Figura 16. Imagen de OCT (A) de mácula sana en comparación con retinografía de polo posterior sano (B) (FOTO DE AUTOR)

Mediante la OCT se pueden detectar cambios histológicos como incremento en el espesor de la retina o presencia de fluido intrarretiniano, que pueden preceder, incluso en semanas, a la sintomatología (pérdida de agudeza visual, aumento de metamorfopsia) presente en la evolución de la DMAE. Por esto se considera la técnica de elección en el diagnóstico y seguimiento de la patología macular (84).

La drusas aparecen en la OCT como engrosamientos y deformidades en el EPR que pueden formar irregularidades y ondulaciones en la banda hiperreflectante correspondiente al mismo (Fig. 17).

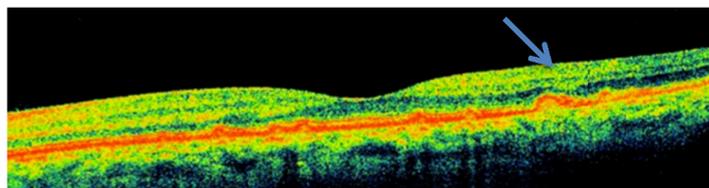


Figura 17. Tomografía de coherencia óptica donde se observan ondulaciones en la capa de EPR correspondientes a drusas maculares (FOTO DE AUTOR).

En la NVC, la OCT permite localizar la membrana neovascular, medir su extensión y detectar la presencia de fluido intrarretiniano acompañante. También permite localizar afectaciones subfoveales, membranas ocultas y medir la respuesta a los fármacos antiangiogénicos valorando la reducción de la lesión, del fluido subretiniano y, por consiguiente, del grosor macular (Fig. 18) (88).

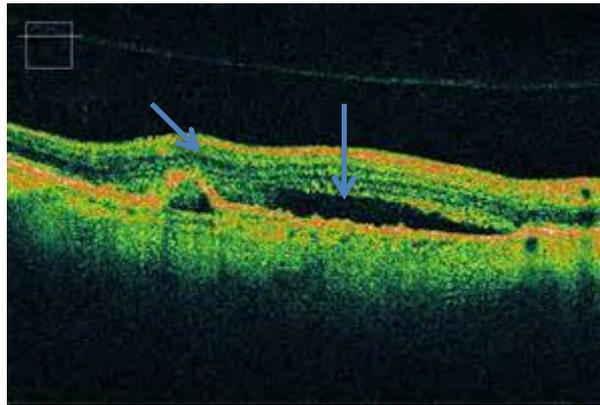


Figura 18. Membrana neovascular subretiniana (flecha izquierda) con presencia de líquido subretiniano (flecha derecha) (FOTO DE AUTOR).

1.5.9. Tratamiento de la DMAE

1.5.9.1. Antioxidantes

La luteína y la zeaxantina son los únicos carotenoides presentes en la mácula (89) y su función es proteger al EPR del estrés oxidativo y del daño de la luz ultravioleta (90). En el año 2001, el estudio AREDS demostró una reducción de progresión a DMAE avanzada y una mejoría de la pérdida de visión en pacientes que tomaban antioxidantes y zinc frente a placebo. Aunque no es necesario realizar tratamiento específico en las fases iniciales de la enfermedad, es recomendable una dieta rica en luteína y zeaxantina, pigmentos presentes en frutas y verduras en general, con mayor concentración en espinacas, brécol, berros, maíz, naranja y yema de huevo (40).

Los suplementos orales de luteína y zeaxantina aumentan la concentración de estos carotenos en la mácula, haciéndola más resistente al daño causado por los radicales libres. En el estudio AREDS 2 se complementaron este tipo de

suplementos con omega-3, ácido graso poliinsaturado presente en el pescado azul y los frutos secos. Dentro de estos ácidos grasos el ácido docosahexaenoico (DHA) es el más directamente implicado en la prevención de las lesiones retinianas derivadas de la edad por su elevado poder antiinflamatorio, antioxidante y antiangiogénico (41).

Se considera que hay un elevado riesgo de progresión a fases avanzadas de DMAE cuando en el examen de fondo de ojo se observan drusas grandes y alteraciones pigmentarias a nivel foveal. Ante estos hallazgos se aconseja iniciar tratamiento oral con antioxidantes (vitamina E, C), luteína, zeaxantina y suplementos minerales (zinc). Si bien no está demostrado científicamente que estos suplementos prevengan la enfermedad, pueden frenar la pérdida de agudeza visual y el avance hacia formas severas de DMAE. También están indicados en pacientes que presentan en un ojo una forma severa de la enfermedad independientemente del estadio de enfermedad en el que se encuentre el otro ojo (16).

1.5.9.2. *Fotocoagulación con láser de argón*

Consiste en la aplicación directa de láser de argón sobre la lesión retiniana. Se emplea en membranas clásicas bien delimitadas de localización extrafoveal y juxtafoveal. Debido al alto grado de recidivas (cerca del 50%) y al riesgo de escotoma irreversible que se puede desarrollar, muchos autores la desestiman y prefieren el empleo de fármacos con capacidad antiangiogénica (91).

También se puede considerar esta modalidad de tratamiento en las lesiones peripapilares (92) y en el tratamiento de la VCP (93) y la RAP (94), con o sin tratamiento coadyuvante (95).

1.5.9.3. *Cirugía*

1.5.9.3.1. *Cirugía submacular*

Es una técnica que asocia vitrectomía con retinotomía y extirpación de la NVC. Las indicaciones más frecuentes son la hemorragia submacular masiva como complicación de la DMAE exudativa (96), y algunas membranas neovasculares

yuxtapapilares cuya extensión no afecta la zona avascular foveal (97). No se ha demostrado efectiva para frenar la enfermedad (84).

1.5.9.3.2. Translocación macular

Es un procedimiento quirúrgico complejo que pretende desplazar y recolocar la fovea sobre el epitelio pigmentario sano tras extracción de la membrana neovascular. En un seguimiento a 12 meses de 50 pacientes intervenidos se obtuvo una mejoría de dos a tres líneas de AV medida con escala EDTRS en el 66% de los casos, mientras que el 28% de los casos mantuvieron estable su AV (98). Por la complejidad de la técnica y que la curva de aprendizaje quirúrgico es grande no está indicada en el manejo inicial de la DMAE exudativa (84).

1.5.9.4. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) consiste en la administración vía intravenosa de verteporfino (Visudyne®), un fármaco fotosensible, y aplicación posterior de luz de una longitud de onda determinada con el fin de que se produzca una reacción fotoquímica en la zona de la lesión y la destruya dejando una cicatriz similar a la cicatriz disciforme típica de fases avanzadas de DMAE. Fue autorizada por la *Food and Drug Administration* (FDA) en el año 2000 para el tratamiento de NVC predominantemente clásica, para el síndrome de presunta histoplasmosis ocular y para la membrana miópica tras la realización de estudios multicéntricos como el estudio TAP (*Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy*) (99) o el VIP (*Verteporfin In Photodynamic Therapy*) (100).

La TFD supuso una mejora con respecto al tratamiento láser, pero debido a la pérdida de AV que presentan los pacientes, como consecuencia de la cicatrización de la lesión, y a la aparición de los fármacos antiangiogénicos, su utilización ha disminuido como monoterapia. A día de hoy, se usa esta terapia combinada con los antiangiogénicos, tratando de disminuir el número de inyecciones de éstos (84).

1.5.9.5. *Terapia antiangiogénica*

1.5.9.5.1. Pegaptanib sódico

El pegaptanib sódico (Macugen®), producido por Pfizer, es el primer fármaco antiangiogénico que se empleó como tratamiento de la DMAE. Es un anticuerpo PEGilado sintetizado a partir de un oligonucleótido de ARN de 28 bases de ARN al que se le han unido 2 grupos polietilenglicol (20-kD) con el fin de aumentar su vida media dentro del globo ocular. Actúa impidiendo la unión de la isoforma 165 del VEGF-A a su receptor (101). La FDA aprobó su utilización en 2004 en base a los resultados del estudio VISION realizado con pacientes con DMAE exudativa tratados en varios centros de Estados Unidos y Canadá (102).

Se emplea una jeringa de 90 microlitros con 0,3 mg de pegaptanib, recomendando una fase de carga de 4 inyecciones, una cada 6 semanas, retratando posteriormente las recidivas hasta conseguir la inactividad de la membrana neovascular (102).

Debido a su menor efectividad frente a otros antiangiogénicos, queda relegado como opción terapéutica para pacientes con DMAE exudativa y factores de riesgo cardiovascular o antecedentes de enfermedad aterotrombótica, ya que presenta un excelente perfil de seguridad sistémica, superior al de bevacizumab y ranibizumab, dos de los antiangiogénicos más empleados en el tratamiento de la DMAE hoy día (84).

1.5.9.5.2. Bevacizumab

El bevacizumab (Avastin®), producido por Genentech Inc/Roche, fue aprobado por la FDA en 2004 para uso exclusivo en el cáncer de colon metastásico. A pesar de que su indicación se ha ido ampliando a otras patologías, no está aprobado en la DMAE exudativa. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1, de 148 kD de peso molecular, desarrollado para frenar la angiogénesis asociada al crecimiento tumoral, ya que es capaz de inhibir todas las isoformas biológicamente activas del VEGF-A (103).

El grupo de Rosenfeld, de la Universidad de Miami, observó en el año 2005 que algunos pacientes con distintas neoplasias y DMAE, de modo concomitante, tratados con bevacizumab sistémico mejoraban su AV (104). Basándose en este hallazgo y para evitar los efectos adversos a nivel sistémico (hemorragias graves) asociados a la administración intravenosa de bevacizumab, decidieron inyectar el fármaco directamente en el vítreo. Los resultados preliminares fueron muy satisfactorios, lo que avaló el uso intravítreo de 0,5 mg del fármaco en Oftalmología (105). No obstante, la vía de administración intraocular tampoco ha sido aprobada por las autoridades sanitarias, permitiéndose solamente su administración como “uso compasivo” (84).

1.5.9.5.3. Ranibizumab

El ranibizumab (Lucentis®), producido por Novartis, es un fragmento de anticuerpo monoclonal (Fab) recombinante humanizado que se une a todas las formas activas del VEGF-A. Tiene un menor peso molecular, 48 kD, que el bevacizumab, lo que le hace tener una mejor penetrancia ocular y poder actuar frente a enfermedades retinianas y coroideas (Fig. 19) (82).

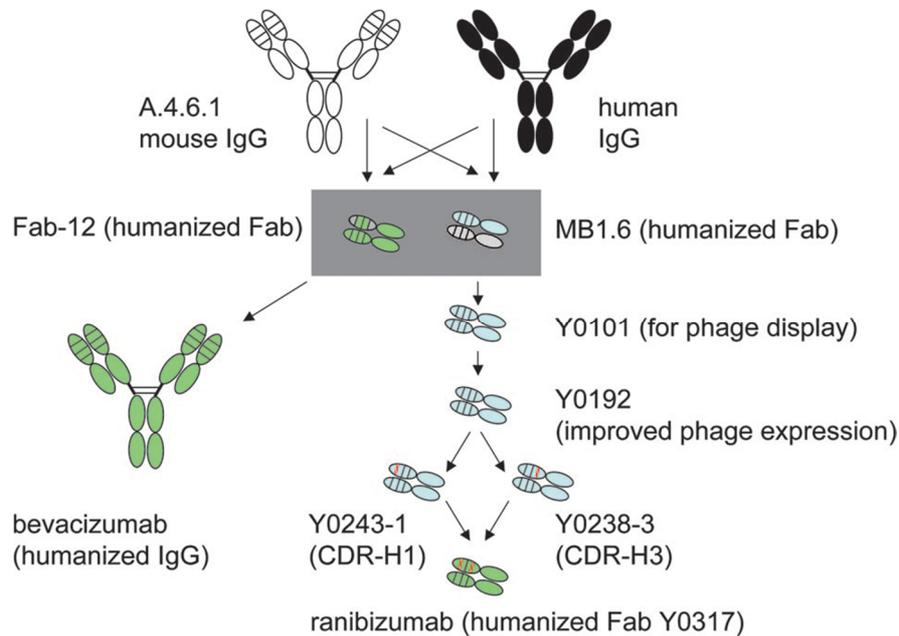


Figura 19. Síntesis de bevacizumab y ranibizumab. En esta figura se ilustran para cada anticuerpo los pasos en su síntesis, empezando por el clon hibridoma de ratón A.4.6.1. Cada color indica un fragmento de las dos cadenas Fab humanizadas. Cada flecha indica diferentes pasos de las dos líneas de los fragmentos Fab unidos al antígeno humanizado. Cada óvalo indica una o más cadenas de DNA recombinante usadas para construir los genes que corresponden a la inmunoglobulina G o a los distintos anticuerpos de la forma Fab. El proceso de selección incluye dos variantes con afinidad independiente Y0243-1 y Y0238-3. Cambios en los aminoácidos fueron combinados e introducidos en el contenido de Fab-12 (variante Fab de bevacizumab) para generar el producto final ranibizumab (82).

Una vez inyectado en el vítreo se une a isoformas de VEGF-A generadas por corte y empalme alternativo del RNA (VEGF121 y VEGF165) y a VEGF110, que es el producto biológicamente activo derivado de la escisión proteolítica de las dos isoformas anteriormente mencionadas. De este modo, la unión de ranibizumab a VEGF-A impide la unión de este a sus receptores de superficie en las células endoteliales (VEGFR-1 y VEGFR-2).

Así, la unión de VEGF y el menor tamaño de la molécula (es un fragmento Fab y no un anticuerpo entero) facilitan la mejor penetración de la molécula en la retina (106).

Se han publicado diversos estudios evaluando los resultados del tratamiento con ranibizumab:

- El estudio MARINA, publicado en 2006, es un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado de pacientes con NVC mínimamente clásica u oculta tratados con inyección intravítrea de ranibizumab (0,3 o 0,5 mg) o con inyección simulada una vez al mes durante 24 meses. El 95% de los pacientes tuvieron mejoría o estabilización de la visión con respecto al 62% de los pacientes con tratamiento simulado al año del inicio del tratamiento. Casi el 40% de los pacientes mejoraron 15 o más letras ETDRS en comparación con el subgrupo simulado (107).

- El estudio ANCHOR fue un nuevo estudio aleatorizado, realizado en el año 2006, doble ciego y controlado con tratamiento simulado de pacientes con NVC predominantemente clásica tratados con ranibizumab y TFD simulada o con inyección simulada y TFD. El 95% de los pacientes tratados con ranibizumab mantuvieron o mejoraron la visión en comparación con el 64% de los pacientes tratados con TFD tanto a los 12 como a los 24 meses. La mejoría media fue de 11 letras y casi el 80% de los pacientes mantuvieron la visión pasados los 24 meses. Todo ello hizo que el ranibizumab fuese aprobado por la FDA como medicamento para la DMAE exudativa en 2006 (108).

- El estudio PIER fue otro ensayo doble ciego, aleatorizado, realizado en el año 2008, que evaluó la eficacia y seguridad de ranibizumab cada mes durante 3 meses y después cada 3 meses con dosis de 0,3 mg y 0,5 mg. La AV mejoró en los 3 primeros meses disminuyendo su efecto en los grupos con administración trimestral (109).

- El estudio PrONTO fue un estudio prospectivo realizado en el *Bascom Palmer Eye Institute* de Miami en el año 2007 con el objetivo de evaluar la eficacia de un régimen variable de dosis de ranibizumab en el tratamiento de pacientes con

DMAE exudativa. Se administraron 3 inyecciones de carga mensuales y se realizó seguimiento mensual a todos los pacientes con retratamiento en caso de que ciertos criterios preestablecidos se cumplieran (denominado PRN o *pro re nata*, a demanda): pérdida de AV de más de 5 letras junto con incremento de fluido subretiniano a nivel macular en la OCT, aumento del grosor retiniano de al menos de 100 μm en la OCT, aparición de nuevas membranas “clásicas”, nueva hemorragia o fluido subretiniano macular en la OCT similar a la situación inicial (110).

- Debido a las limitaciones del PrONTO en cuanto a tamaño muestral y a que no fue comparado con un grupo control, se llevó a cabo el estudio SUSTAIN en el año 2011, con 3 inyecciones en fase de carga y retratamiento en casos similares al PrONTO. La ganancia de letras no se mantuvo al pasar a pauta PRN (111).

- El estudio SAILOR se realizó en el año 2009 y es el mayor estudio diseñado hasta la fecha para evaluar la eficacia y seguridad del ranibizumab (4.300 pacientes). En este ensayo fase IIIb, de 12 meses de duración, se estudiaron 2 cohortes. En la primera, los pacientes se aleatorizaron a dos concentraciones de ranibizumab (0,3 mg y 0,5 mg), con dosis de 3 meses de carga y pauta PRN con criterios parecidos a los utilizados en el PrONTO en cuanto al retratamiento. Se tuvo en cuenta en el análisis de los resultados si los pacientes habían recibido tratamiento previo o no. En la segunda cohorte, independientemente de si habían recibido tratamiento previo o no, a los pacientes se le administró una inyección del fármaco (0,5 mg) seguida de PRN. Los resultados apoyaron la seguridad de ranibizumab, aunque las mejoras de AV fueron menores a las del tratamiento mensual (112).

- En 2007, Spaide sugiere el protocolo “*treat and extend*” que consiste en que el paciente es tratado mes a mes hasta la desaparición del fluido subretiniano o intraretiniano en la OCT, momento en el que recibiría una inyección adicional en una mácula sin indicios de actividad. La siguiente visita se alargaría hasta las 6 u 8 semanas, retratando en caso de reaparición de fluido y realizando una nueva visita a las 4 semanas. En caso de que en esta visita no se apreciase fluido retiniano en la OCT, se retrataría igualmente y se alargaría la próxima visita hasta las 10-12

semanas. De este modo se intenta mantener el máximo beneficio con el mínimo número de inyecciones pero adelantándose a posibles reactivaciones de la enfermedad (113).

- El estudio HORIZON, realizado en 2008, indica que el tratamiento mensual sería preciso en una proporción considerable de pacientes incluso después del segundo año de terapia. En este estudio, de largo seguimiento, se demuestra que la disminución de la frecuencia de inyecciones en el tercer y cuarto año se asocia a pérdida de agudeza visual. Por este motivo, los tratamientos “a demanda” parecen insuficientes más allá del segundo año de tratamiento siendo necesarios seguimientos mensuales de estos pacientes (114).

- El estudio CATT (*Comparison of Age Related Macular Degeneration Treatments Trials*) se inició en el año 2008, financiado por el Instituto Nacional de Salud de EEUU para evaluar la eficacia del bevacizumab en sustitución del ranibizumab para el tratamiento de la DMAE húmeda. En mayo de 2011 se publicaron los resultados presentando ambos tratamientos una eficacia parecida, tanto en régimen mensual como a demanda, con similares efectos adversos oculares, pero con efectos sistémicos más graves con bevacizumab (24%) frente a ranibizumab (19%) (115).

1.5.9.5.5. Aflibercept

El aflibercept (Eylea®), producido por Bayer, es una proteína de fusión de 115 kDa denominada *VEGF-Trap-eye* por su mecanismo de acción que consiste en atrapar diferentes isoformas del VEGF impidiendo sus efectos (116).

Combina la fracción constante típica de cualquier IgG con una fracción variable construida con partes de los receptores de VEGF 1 y 2. Por ello, es capaz de inhibir no sólo la acción del VEGF-A, sino también otros factores proangiogénicos como el VEGF-B y el PlGF, con un posible efecto sinérgico en su eficacia al inhibir la vasculogénesis y la angiogénesis. El VEGF-B y el PlGF solo se unen al receptor VEGFR1 y, a diferencia de lo que ocurre con el VEGF-A, no son esenciales para el desarrollo normal de los vasos sanguíneos o para la angiogénesis fisiológica del adulto. Sin embargo, al igual que el VEGF-A, el VEGF-B y el PlGF

están también implicados en la remodelación vascular patológica (117).

La afinidad a las diferentes isoformas de VEGF es mucho mayor que a su propio receptor y es casi 100 veces mayor que la de ranibizumab y bevacizumab. El perfil de seguridad en los ensayos clínicos es excelente, y similar al de otros fármacos antiangiogénicos (118).

La autorización de aflibercept para su empleo en DMAE húmeda se basa en los resultados positivos de dos estudios paralelos en fase III denominados VIEW1 y VIEW2 (119). En estos estudios, el aflibercept administrado cada 8 semanas tras una dosis de carga inicial de 3 inyecciones demostró su no inferioridad frente al ranibizumab suministrado mensualmente durante el primer año de seguimiento.

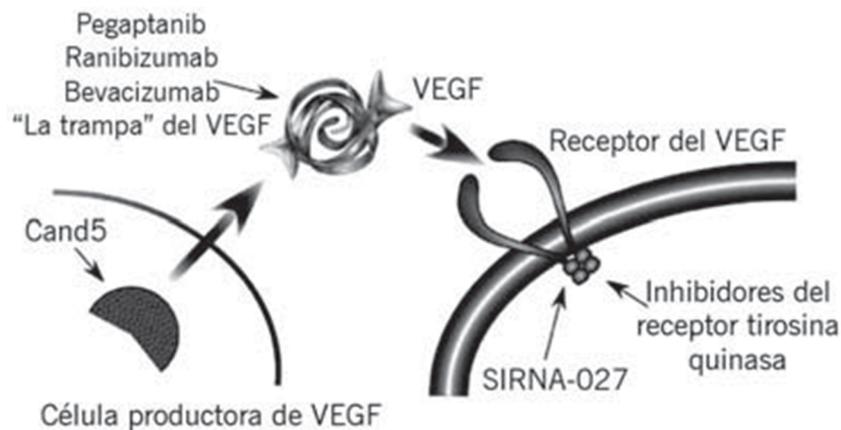


Figura 20. Mecanismo de acción de los fármacos antiVEGF (120).

1.5.8.5.6. Otros fármacos

La acción de algunos fármacos frente a receptores tirosincinasa permite inhibir todas las vías de acción del VEGF y otras moléculas susceptibles a nivel intracelular, lo que presupone una acción más potente que la inhibición selectiva del VEGF (70). Así, el sorafenib, comercializado como Nexavar® por Bayer, es un inhibidor de VEGFR2 y 3, PDGFR y Raf cinasas aprobado para el tratamiento de carcinomas renales y hepatocelulares (121). VEGF no es la única proteína involucrada en el desarrollo de la NVC. El bloqueo combinado de VEGF y de PDGF

se ha demostrado superior que el bloqueo aislado del VEGF. Por otra parte, FGF contribuye al crecimiento de la membrana neovascular una vez se ha producido la disrupción tisular. El bloqueo dual del receptor tirosincinasa de VEGF y de PDGF proporciona una doble vía de acción sobre la NVC, inhibiendo tanto su crecimiento como su permeabilidad (73).

En el año 2008, Kernt y colaboradores describen la mejoría en la DMAE exudativa de un paciente con carcinoma renal en tratamiento con sorafenib (122). En base a este resultado se empleó como uso compasivo combinado con el ranibizumab para el tratamiento de dos pacientes con NVC por DMAE refractaria al tratamiento habitual. Su administración a dosis de 200 mg tres veces por semana (muy inferior a su dosificación para el tratamiento de tumores -800 mg/día-) consiguió reducir el líquido subretiniano en el control tomográfico y la estabilidad o mejoría visual en los dos pacientes tratados, sin registrarse efectos secundarios (123).

El sunitinib y el pazopanib han demostrado su poder de inhibición de los receptores tirosincinasa y con ello de la NVC (124). El sunitinib fue aprobado por la FDA para el tratamiento del carcinoma de células renales y de tumores del estroma gastrointestinal. El sunitinib inhibe las señales celulares por unión a múltiples receptores tirosincinasa incluyendo todos los receptores de PDGF y el receptor R2 del VEGF que desempeñan un papel en la angiogénesis y proliferación de las células tumorales. La inhibición simultánea de estos objetivos permite reducir tanto la vascularización como el crecimiento tumoral (125).

En el año 2015 se publicó un ensayo clínico de fase II que compara el tratamiento combinado de ranibizumab y un fármaco anti-PDGF llamado Fovista® (pegpleranib) frente a ranibizumab en monoterapia. A pesar de que se tenían grandes expectativas en esta herramienta terapéutica los resultados no han demostrado superioridad en la combinación de fármacos frente a ranibizumab (126).

1.6. FARMACOGENÉTICA

La farmacogenética estudia la respuesta farmacológica del individuo según su genotipo, es decir, los factores genéticos que influyen en la variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos (127).

En 1957, Motulsky documentó por primera vez que los defectos genéticos heredados en el metabolismo de los fármacos podían explicar las diferencias individuales en la respuesta a los medicamentos. El término de “farmacogenética” fue propuesto en 1959 por Vogel para designar el estudio de la variación de los genes individuales en la respuesta a los medicamentos (128).

La descodificación del genoma humano ha puesto de manifiesto que el 99,9% del ADN es igual para todos los individuos, de modo que sólo hay una diferencia del 0,1% entre dos personas distintas. El estudio de este 0,1% de ADN diferente permite conocer la posible relación entre regiones del genoma con predisposición a originar determinadas enfermedades e identificar mutaciones genéticas que explican las diferentes respuestas individuales ante la enfermedad y los diferentes tratamientos (129).

Uno de los principales problemas de la farmacología clínica es la existencia de una amplia variabilidad en la respuesta a los fármacos, tanto en efectividad como en toxicidad. Dicha variabilidad, además de deberse a factores relacionados con la severidad de la enfermedad o sus complicaciones, también puede estar relacionada con factores ambientales y genéticos (128).

El fundamento de la variabilidad de la respuesta a los medicamentos hay que buscarlo en los polimorfismos genéticos, que hacen referencia a la existencia de múltiples alelos en un mismo locus del genoma humano. Es decir, son variaciones en una secuencia de un lugar determinado de ADN entre individuos de una misma población (129). Los polimorfismos se diferencian de las mutaciones en que en éstas últimas el cambio genético suele resultar en una proteína defectuosa que de manera variable conlleva a la aparición de una enfermedad. Los polimorfismos son cambios frecuentes (en un 1% o más de la población) y se encuentran en aproximadamente 1 cada 1.250 nucleótidos mientras que las mutaciones son

infrecuentes y afectan a una cifra menor al 1% de la población (130). Se estima que estos cambios genéticos pueden ser responsables de entre el 20 y el 95% de la variabilidad de los efectos a los fármacos (131).

El tipo más común de variación genética es el denominado Polimorfismo de Nucleótido Simple (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) que constituye hasta el 90% de todas las variabilidades genómicas (Fig. 21). Se trata de una variación de sólo una base en la secuencia del ADN del genoma humano dando lugar a la síntesis de un aminoácido diferente tras la lectura del gen. La gran mayoría no tienen repercusión funcional pero hay otras que repercuten en la expresión de proteínas o en su secuencia y constituyen la principal variación en el componente genético de las enfermedades complejas (132).

De este modo, los SNP se consideran los marcadores genéticos ideales en la búsqueda de genes de susceptibilidad de una enfermedad o de genes que determinan la respuesta a fármacos (133).

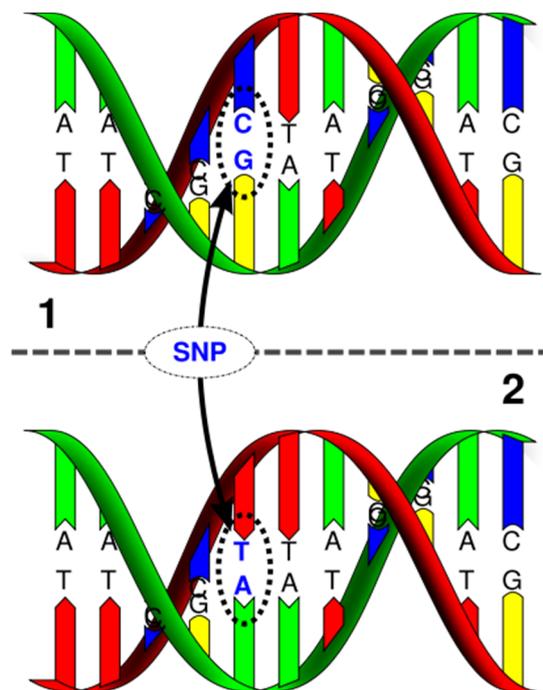


Figura 21. Esquema de polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (134).

Así pues, la farmacogenética tiene como objetivo demostrar que el estudio en la variación del ADN (polimorfismos genéticos) puede ayudar a predecir la respuesta farmacológica en aquellos pacientes que tengan los mismos criterios genéticos y, por lo tanto, saber cuál es el medicamento más efectivo y cuál es la probabilidad de que exista un efecto secundario al mismo (131).

Debido a los rápidos avances en el estudio del genoma humano, se habla de farmacogenómica como la disciplina que estudia las bases genéticas de la enfermedad para definir nuevas dianas terapéuticas o marcadores moleculares que evalúen la eficacia de nuevos fármacos (127).

El objetivo de la farmacogenética es optimizar el tratamiento de las enfermedades a través de una terapia personalizada más segura y eficiente, con el fin de seleccionar los pacientes que podrían responder mejor o peor a un fármaco determinado, seleccionar la medicación más adecuada para un determinado paciente y poder escoger las dosis más adecuadas de fármaco. Es decir, seleccionar el fármaco y las dosis más adecuadas para un determinado paciente sabiendo *a priori* la eficacia y los posibles efectos adversos (135).

Actualmente, la farmacogenética está muy extendida en el campo de la investigación pero poco en el de la clínica (128).

1.7. GENÉTICA EN LA DEGENERACIÓN MACULAR

1.7.1. Susceptibilidad genética en la DMAE

Los estudios de herencia aplicados a Oftalmología y en especial a la DMAE, han despertado un notable interés por su importancia en la práctica clínica.

La DMAE es una enfermedad multifactorial en la que la interacción de factores ambientales y genéticos ha demostrado tener un fuerte peso etiopatogénico. Al igual que en otras entidades, no existe un único gen capaz de inducir la enfermedad, pero se ha puesto de manifiesto la presencia de un notable número de polimorfismos implicados en su patogénesis (136).

La influencia genética en la DMAE se valoró en estudios familiares realizados en los años 90. Los parientes de primer grado de pacientes que padecían DMAE presentaron mayor riesgo de contraer la enfermedad que los parientes de primer grado de personas sanas. Además presentaban la enfermedad a edades más tempranas y con formas más avanzadas de DMAE (137). Seddon y colaboradores estudiaron la DMAE en gemelos monocigotos y dicigotos estimando la influencia de la herencia al obtener resultados estadísticamente significativos con un rango de asociación con la enfermedad entre el 46 y el 71% (138).

En pacientes con distrofias maculares y retinianas ligadas a la herencia se realizaron estudios de asociación de genes implicados en estas entidades y en la DMAE, ya que las formas tempranas de estas enfermedades presentan los mismos signos clínicos que las formas avanzadas de DMAE. Esto podía sugerir una relación entre los genes que controlan estas dos entidades, aunque no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas (139).

El Proyecto Genoma Humano condujo a la elaboración del HapMap, en 2003, que es la colección de todos los polimorfismos presentes en el DNA humano. Estos estudios de asociación del genoma completo (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS) se basan en análisis estadísticos que permiten examinar las variantes genéticas, como los SNPs, asociados a un fenotipo en particular, identificando nuevos genes asociados a dicho fenotipo.

Gracias a GWAS se han descubierto genes implicados en enfermedades complejas como la diabetes, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la DMAE (140-142).

1.7.1.1. *Genes relacionados con la DMAE*

En el caso de la DMAE, a principios del año 2016 se encontraron 52 genes localizados en 34 locus diferentes asociados a susceptibilidad de esta enfermedad (143). Estos genes intervienen fundamentalmente en la vía del complemento, del estrés oxidativo, de la angiogénesis y en la respuesta al tratamiento.

1.7.1.1.1. La vía del complemento

A pesar de los trabajos realizados en los años 90, fue en 2005 cuando se encontró una fuerte asociación entre la DMAE y las variantes genéticas del gen del factor H del complemento (*Complement Factor H, CFH*) (144, 145).

La vía del complemento es uno de los elementos más importantes del sistema inmune. Sus funciones son múltiples: lisis de microorganismos, eliminación de células muertas y partículas extrañas, activación de células inflamatorias y modulación de la respuesta mediada por anticuerpos, entre otras (146). Se trata de un mecanismo de respuesta inmune configurado en una cascada de activación de enzimas que se organiza en tres rutas enzimáticas (147):

- La ruta clásica del complemento, iniciada por la unión de un antígeno y un anticuerpo en la superficie celular.
- La ruta de las lectinas, activada por el reconocimiento de residuos de manosa presentes en la superficie de algunos patógenos.
- La ruta alternativa del complemento, activada en caso de infección, a un nivel basal más bajo, por el factor del complemento C3B (Fig. 22).

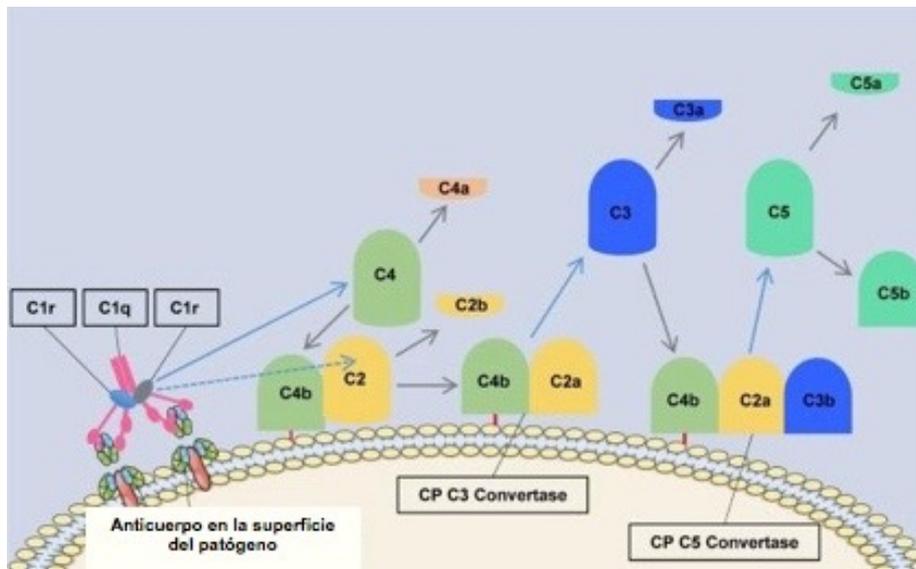


Figura 22. Esquema donde se representan la vía clásica y la vía alternativa del sistema de complemento (148).

Todas estas vías convergen en el punto en el que C3 pasa a C3B por la C3-convertasa, que activa la C5-convertasa llevando a la formación del complejo de ataque de membrana (*Membrane Attack Complex*, MAC) y, como punto final, a la muerte o destrucción del patógeno (149).

El CFH es una glucoproteína sérica producida en el hígado y localmente en el ojo por las células del EPR, de la membrana de Bruch y de los capilares coroideos (150). Su función principal es inhibir la C3-convertasa impidiendo la activación de la vía alternativa del complemento. Además, el CFH se une a la proteína C reactiva (PCR), reactante de fase aguda que aumenta en situaciones de inflamación, infección o daño tisular tanto en el ojo como en otras partes de organismo (144).

En estudios histológicos realizados en ojos de donantes desde la década de los 90 se ha demostrado la presencia de CFH y MAC, entre otros factores del complemento, en las células del EPR y en las drusas, lo que sugiere que estas son superficies celulares de activación de la cascada del complemento (46, 52, 151). Así pues, los mecanismos de inflamación local acompañados por la activación del complemento, la muerte celular y la respuesta inmune son claves en la patogenia y progresión de la DMAE (47).

El gen del CFH está localizado en la región cromosómica 1q32, en la región centrométrica del cluster regulador de la activación del complemento (*Regulator of Complement Activation*, RCA), cerca de regiones codificadoras de proteínas reguladoras de la activación de C-convertasa. Diversas patologías como el síndrome hemolítico urémico atípico, la glomerulonefritis membranoproliferativa y la DMAE se han asociado con las diferentes mutaciones y polimorfismos de este gen (152).

Gracias al HapMap y a otros trabajos llevados a cabo en el año 2005, se identificó el polimorfismo que se ha asociado con mayor riesgo para la DMAE, el Y402H (130). Este polimorfismo se localiza en el exón 9 del gen *CFH*, T1277C en la posición rs1061170 y conlleva la sustitución de una tirosina por una histidina en el aminoácido de la posición 402 (tyr402his). En condiciones normales, el CFH se une a las células de EPR y a la membrana de Bruch pero ante la presencia del

polimorfismo Y402H se altera esta unión, activándose el complemento y la inflamación local en el espacio subretiniano y, como consecuencia del ataque de MAC, se produce daño y pérdida de fotorreceptores (143) (Fig.23).

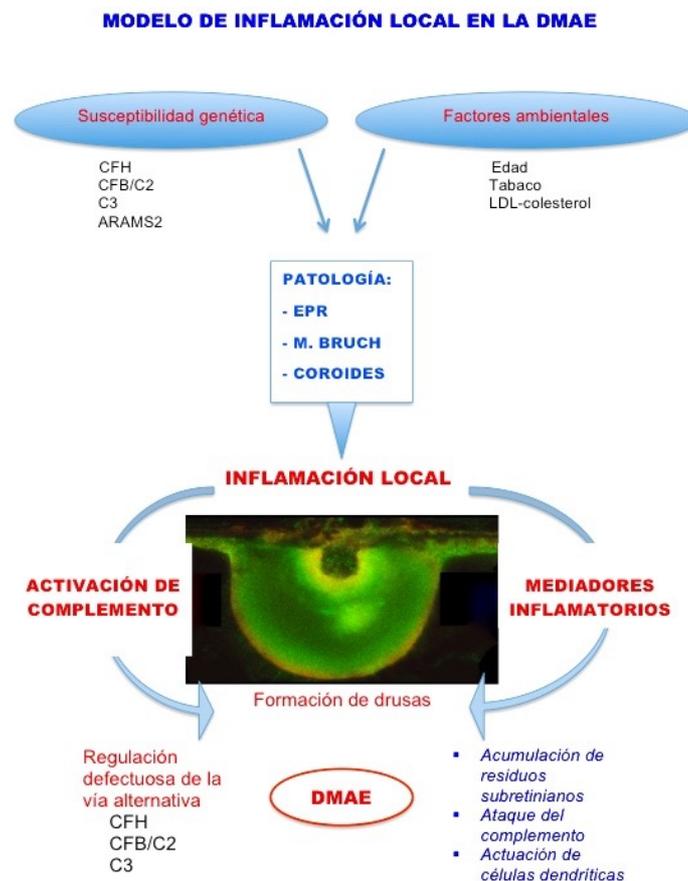


Figura 23. Modelo de inflamación de la degeneración macular (adaptado de Anderson y colaboradores 2010). La DMAE puede estar provocada por uno o más factores de riesgo ambientales en el contexto de un perfil de susceptibilidad genética. Esta confluencia de factores de riesgo genéticos y ambientales da lugar a cambios patológicos en la interfase EPR-coroides generando una respuesta inflamatoria crónica local que incluye la activación del complemento y otros eventos de la inflamación. Debido a esta inflamación se producen alteraciones en membrana de Bruch, drusas, acumulación de depósitos subretinianos y activación de células dendríticas. Con el tiempo, estos procesos derivan en la degeneración de los fotorreceptores y la pérdida de la visión central que define la DMAE (153).

Por otro lado, el polimorfismo Y402H también afecta a la unión CFH-PCR, aunque algunos autores sugieren que este hallazgo puede ser un artefacto propiciado por las condiciones experimentales (154). Posiblemente, la alteración de esta unión justifique que individuos homocigotos para Y402H presenten niveles elevados de PCR en la coroides (155).

La asociación entre este polimorfismo y el riesgo de padecer DMAE se ha confirmado en numerosos grupos raciales excepto en asiáticos (156). Así, la frecuencia del alelo de riesgo Y402H y la prevalencia de DMAE avanzada es mayor en la población europea (157). Un metaanálisis confirmó que la variante alélica C incrementa el riesgo de padecer DMAE del 2,1 al 4,6 en individuos heterocigotos y del 3,3 al 7,4 en individuos homocigotos (158). Asimismo, se ha demostrado que puede ser un factor predictor al tratamiento en estudios farmacogenéticos (159), mostrando peor respuesta a ranibizumab y bevacizumab los pacientes homocigotos frente a los heterocigotos.

Se han identificado otras alteraciones en regiones no codificantes del CFH (160) y en regiones codificantes de otros elementos del complemento como C2, el factor B del complemento (*Complement Factor B*, CFB) (ambos localizados en el cromosoma 6 dentro de la región del complejo mayor de histocompatibilidad) y el factor I del complemento (*Complement Factor I*, CFI) (161).

Se han relacionado también polimorfismos del factor 3 del complemento con la aparición de formas húmedas de DMAE, aunque con menos evidencia científica que en el polimorfismo de CFH. En el estudio CATT, Hagstrom y colaboradores encontraron el alelo G del SNP rs2230199 como alelo de riesgo para sufrir la enfermedad (162).

Por todo esto, en la actualidad se admite que el complemento tiene un papel fundamental en la patogenia de la DMAE aunque se desconozca el mecanismo por el cual sus variantes genéticas conllevan al desarrollo de la enfermedad.

1.7.1.1.2. El estrés oxidativo

El daño oxidativo está relacionado con la etiopatogenia de la DMAE. Se ha encontrado asociación entre mutaciones en genes que inician o reparan los daños de la oxidación y la predisposición o progresión en la DMAE. Las mitocondrias son las organelas celulares encargadas de controlar el proceso de oxidación en la retina (163).

1.7.1.1.2.1. Gen de susceptibilidad a la maculopatía asociada a la edad tipo 2 (ARMS2)

El gen de la susceptibilidad a la MAE tipo 2 (LOC387715) (*Age-Related Macular Susceptibility 2, ARMS2*) se ha postulado como el segundo gen con mayor asociación a la DMAE, con independencia del gen del CFH, especialmente en las formas avanzadas de la enfermedad, tanto húmedas como atróficas (145). Se localiza en la región cromosómica 10q26. Su alelo de riesgo contiene una adenosina en lugar de una guanina en el exón 1 causando un cambio de una alanina por una serina (A69S) en la proteína final. Se desconoce el mecanismo por el cual esta nueva proteína causa la enfermedad (164).

La proteína ARMS2 se ha localizado en las mitocondrias de los fotorreceptores de la retina, desconociéndose asimismo su función. Las alteraciones en la mitocondria provocan un acúmulo de mutaciones en el ADN mitocondrial afectando al metabolismo energético celular y de los radicales libres, activando rutas de apoptosis o muerte celular. Por ello, se piensa que la proteína con la mutación 69S en lugar de ARMS2 tipo silvestre puede dañar los fotorreceptores retinianos (165).

Otros estudios genéticos sugieren la modificación del ARMS2 por el tabaco (163), lo que implicaría aún más el riesgo del estrés oxidativo en la etiopatogenia de la DMAE.

No obstante, algunos trabajos recientes tratan de localizar a la proteína ARMS2 en el citosol de las células y la ARMS2 con la mutación A69S en el citoesqueleto (166), poniendo en duda la relación entre ambas proteínas y su asociación con la DMAE.

1.7.1.1.2.2. Gen de la serín peptidasa 1 de alto requerimiento de temperatura (*HTRA1*)

Usando técnicas de GWAS se detectó también en la región q26 del cromosoma 10 otro gen asociado con la DMAE, el gen de la serín peptidasa 1 de alto requerimiento de temperatura (*High Temperature Requirement serin peptidase A1, HTRA1*) (161). *HTRA1* es una serín peptidasa que juega un papel fundamental en la degradación extracelular de las proteínas de membrana (167). En estudios inmunohistoquímicos se han encontrado niveles elevados de esta enzima en el interior de las drusas en pacientes con DMAE (168). La proximidad a la región codificadora de *ARMS2* hace que variabilidades genéticas puedan influir también en la secuencia de *HTRA1*, que está tan sólo alejada unas kilobases, y que ambos genes influyan en la susceptibilidad de padecer DMAE (169).

La implicación de *HTRA1* fue confirmada en una cohorte de población china donde, tras marcar inmunológicamente anticuerpos anti*HTRA1*, se observó una intensa tinción en las drusas de pacientes con DMAE. También se observó una mayor expresión de ARN mensajero de *HTRA1* en el alelo de riesgo de rs1200638 en los linfocitos y en el EPR de pacientes con la enfermedad. El riesgo de enfermedad asociado a este gen fue mayor entre los asiáticos que entre los caucásicos (168).

Un metaanálisis, basado en polimorfismos de *HTRA1*, realizado en base a 14 estudios de casos y controles indicó una fuerte asociación con la DMAE, con mayor frecuencia de enfermedad en sujetos homocigotos para el alelo de riesgo (51).

1.7.1.1.3. La vía de la angiogénesis

1.7.1.1.3.1. Gen del factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*)

Debido a que la forma exudativa de la DMAE está caracterizada por una NVC el gen que codifica *VEGF* se ha convertido en candidato perfecto para el estudio tanto de susceptibilidad genética a padecer la enfermedad como de posibles estrategias terapéuticas. Este gen se localiza en la región q21.3 del cromosoma 9, tiene 8 exones separados por 7 intrones y pertenece a la familia de genes que codifican también a *VEGF-B, C, D* y a *PIG* (170).

Se ha estudiado la relación entre la patogenicidad de la DMAE y varios polimorfismos del gen de *VEGF-A*. En los primeros estudios realizados no se observó correlación: Así, Boekhoorn y colaboradores analizaron en 4.228 pacientes, procedentes de la cohorte del estudio de Rotterdam, tres SNPs del gen del VEGF (C2578A, G1154A y G634C) sin que ninguno de ellos demostrase una asociación significativa con el riesgo de desarrollar DMAE (171). Por su parte, Richardson y colaboradores tampoco observaron relación entre la DMAE y 7 polimorfismos diferentes (172) en 577 pacientes afectados de DMAE.

Otros autores sí han encontrado relación entre diferentes polimorfismos del gen de *VEGF-A* y formas húmedas de DMAE: Churchill y colaboradores estudiaron en 45 individuos con DMAE húmeda 14 SNP del gen de VEGF encontrando una asociación significativa con el riesgo de DMAE en el SNP +674 CC. En el estudio por haplotipos, en lugar de por SNPs aislados, también encontraron asociación entre varios haplotipos asociados tanto a un mayor riesgo de enfermedad como a un efecto protector frente a DMAE (173). Haines y colaboradores estudiaron en una serie de 162 familias con DMAE y en otra de 339 casos 5 SNP del gen de VEGF que se asociaron con mayor riesgo de desarrollar DMAE en ambos grupos (174). Lin y colaboradores encontraron asociación del SNP +936 C/T con un mayor riesgo de DMAE en un estudio con 190 casos (175). Janik-Papis y colaboradores encontraron asociación entre los polimorfismos -460C>T y -634G>C y un mayor riesgo de presentar DMAE (176).

Hoy día, el gen de *VEGF-A* se considera el biomarcador de angiogénesis con mayor asociación en la conversión a formas húmedas de esta entidad (177).

El receptor de VEGF (*VEGFR-2*) es el principal mediador de los efectos patológicos de VEGF en el ojo. La unión con su receptor produce dimerización y autofosforilación, seguido por la fosforilación de numerosas proteínas relacionadas con la transducción de señales celulares, tales como fosforilasa C, PI3-cinasa, proteína de activación GTPasa y la familia de proteínas SRC (involucradas en procesos cancerígenos) (68). Un estudio de 2009 verifica la relación de 22 SNPs del gen de *VEGFR-2* con la susceptibilidad de DMAE húmeda (178).

1.7.1.1.3.2. Gen del inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz 3 (TIMP-3)

Otro gen que ha demostrado susceptibilidad de DMAE es el gen del inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz 3 (*Tisular Inhibitor Metaloproteinasa 3*, TIMP-3), que se encuentra en el cromosoma 22. La hipoxia tisular hace que las células del EPR produzcan VEGF y con ello aumenta la producción de óxido nítrico y MMP. Las MMP están implicadas en la degradación de la matriz extracelular y por ende, en la angiogénesis (55). La familia TIMP-3 tiene propiedades antiangiogénicas, sugiriéndose su acción a nivel de la membrana de Bruch impidiendo que los neovasos coroideos penetren en el espacio subretiniano. Al inhibir TIMP-3 a las MMP, se piensa que un aumento de TIMP-3 puede retrasar la renovación de la membrana de Bruch resultando en un engrosamiento de la misma y como consecuencia de esto, dañando los fotorreceptores (179).

Los pacientes con distrofia pseudoinflamatoria de Sorsby presentan degeneración macular y NVC entre la cuarta y sexta décadas de la vida. Estos pacientes tienen mutaciones en TIMP-3 que alteran el plegamiento proteico presentando así una membrana de Bruch engrosada que contiene agregados de TIMP-3 (180). Estos agregados de TIMP-3 en la membrana de Bruch aumentan con la edad, estando anormalmente elevados en pacientes con degeneración macular (181).

Chen y colaboradores en 2010 encontraron un locus de susceptibilidad cerca de *TIMP-3* y asociado al gen *SYN3* que parece estar implicado en la DMAE de inicio temprano (182). Fritsche y colaboradores, por su parte, identificaron, a principios de 2016, mediante GWAS, una asociación estadísticamente significativa entre la elevación de MMP 9 y el descenso de TIMP-3 en pacientes con DMAE húmeda (143).

1.7.1.1.3.3. Gen de la Fibulina-5

En la degradación de matriz extracelular se ha relacionado también al gen de fibulina-5. La fibulina-5 es una proteína de la matriz extracelular que participa en la polimerización de elastina en fibrillas maduras. Se cree que una disminución en la producción o una interacción defectuosa entre la fibulina-5 y las proteínas de la

membrana de Bruch pueden predisponer a DMAE (183). Aunque se han encontrado varias mutaciones sin sentido en los cinco genes de la fibulina en pacientes con DMAE, su asociación con esta enfermedad como biomarcador específico todavía tiene que ser probada (184).

1.7.1.1.3.4. Gen de la lipasa hepática (*LIPC*)

En 2010, Neale y colaboradores publicaron un GWAS que relaciona el gen que codifica la lipasa hepática (*LIPC*) con la DMAE. El alelo T del polimorfismo de nucleótido simple *LIPC* aumenta los niveles de HDL-colesterol y disminuye el riesgo de DMAE (185). Por otro lado, se ha demostrado que la lipasa hepática tiene un impacto en la aterogénesis (186) y que los factores de riesgo cardiovascular se asocian con la DMAE (187). Tanto la capa íntima de los vasos sanguíneos en la aterosclerosis y la membrana de Bruch en la degeneración macular pueden sufrir cambios similares relacionados con la edad (188). Ya que parece existir una relación entre la NVC y la aterosclerosis (36) ambas enfermedades podrían presentar respuestas paralelas a la lesión tisular inducida por factores como la variación genética, la respuesta inmune deteriorada o el estrés oxidativo, aunque son necesarios más estudios para encontrar una asociación clara.

1.7.1.1.4. Otros genes relacionados con la DMAE

1.7.1.1.4.1. Gen de apolipoproteína E (*ApoE*)

Varios estudios han cuestionado la importancia de las isoformas de *ApoE* que contribuyen a la DMAE. El gen de la apolipoproteína E (*ApoE*), localizado en el cromosoma 19, fue objeto de estudio como gen candidato a ser biomarcador de DMAE debido a su presencia en las drusas, su papel en el transporte de lípidos y su asociación con otras enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer (189). Existen tres isoformas de *ApoE*: Epsilon 2 (E2), Epsilon 3 (E3), y Epsilon 4 (E4). Esta última parece tener un efecto protector sobre las otras isoformas en el desarrollo de DMAE (190). En contraste, en otro estudio se observó que la isoforma E2 confería un aumento de riesgo 1,5 veces mayor de padecer DMAE (189). En el año 2004 Baird y colaboradores hallaron un riesgo significativamente mayor de progresión de DMAE en una población de mujeres con el genotipo E2, en relación con el genotipo E4 del gen *ApoE*, lo que sugiere una posible

participación de género en el riesgo de padecer la enfermedad (191). Un metaanálisis de Thakkinstian y colaboradores llegó a la conclusión de que existe un riesgo del 20% atribuible a E2 y un efecto protector del 40% para E4 en herencia autosómica dominante y autosómica recesiva, respectivamente (192).

1.7.1.4.2. Gen de la Enfermedad de Stargardt (*ABCA4*)

Otros estudios de genes candidatos se centraron en los genes implicados en las distrofias maculares con similitudes clínicas con DMAE. Uno de los primeros genes que apareció para exhibir una asociación con DMAE fue *ABCA4* (el gen de la enfermedad de Stargardt) (169). Pese a que este gen desempeña un papel fundamental en el ciclo visual no se ha podido demostrar su asociación con la DMAE (139).

1.7.1.1.5. Otros genes de susceptibilidad de padecer DMAE

Un reciente estudio de asociación del genoma completo ha mostrado diecinueve *loci* genéticos susceptibles de padecer DMAE, siete de los cuales no habían sido localizados anteriormente (*COL8A1/FILIP1L*, *IER3/DDR1*, *SLC16A8*, *TGFBR1*, *RAD51B*, *ADAMTS9* y *B3GALTL*).

Además, dicho estudio analizó las rutas en las que estarían implicadas todos estos genes, siendo las más destacadas el metabolismo lipídico, la activación del complemento, la angiogénesis y la inflamación. Los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2*, *COL8A1L/FILIP1L*, *TGFBR1* están relacionados directa o indirectamente en el proceso de angiogénesis y *RAD51B* está implicado en el proceso de reparación de ADN (193).

1.7.1.1.5.1 Gen de la desintegrina y metaloproteasa 9 con motivos tipo tromboespondina tipo 1 (*ADAMTS9*)

Las proteínas multidominio *ADAMTS* (*A Disintegrin-like and Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1 Motifs*, Dominio similar a desintegrina A y metaloproteasa con motivos de Tromboespondina tipo 1) tienen demostrada funcionalidad metaloproteínica y un potencial papel en la angiogénesis. Así, *ADAMTS9* es capaz de inhibir la angiogénesis en el cáncer esofágico y nasofaríngeo al disminuir los niveles de expresión de factores pro-angiogénicos como la

metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) y el VEGF-A. Se especula que se debe a la presencia de los dominios tromboespondina presentes en la región C-terminal de su estructura proteica (194). La tromboespondina tipo 1 es una proteína que modula la proliferación de células endoteliales, la adhesión, la migración y la apoptosis y que antagoniza específicamente la función de VEGF al inhibir la activación de la proteína MMP9. Esta, a su vez, inhibe la movilización de VEGF desde la matriz extracelular e inhibe la transducción de señales de VEGF (195). En el GWAS de Fritsche y colaboradores se ha descrito un SNP (rs6795735) localizado a 32,5 kb del inicio de la transcripción de la proteína ADAMTS9, proteína expresada por las células endoteliales, asociado a un elevado riesgo de DMAE (193). ADAMTS9 es una proteína expresada por las células endoteliales vasculares (196). Aunque todavía no se ha conseguido localizar ADAMTS 9, su presencia en células del EPR se cree que podría estar implicada en la enfermedad inflamatoria ocular. Su función es fundamental en el mantenimiento de la estructura de la matriz retiniana, papel necesario en la DMAE y en otras patologías retinianas como la coroidorretinopatía central serosa, enfermedad caracterizada por el acúmulo de líquido entre las capas de la retina en la región foveal (197).

Una variante genética podría influir en la susceptibilidad a padecer DMAE y en la respuesta al tratamiento. Whitmore y colaboradores encontraron que en ojos de pacientes con el genotipo de alto riesgo de CFH existía una disminución de la expresión de ADAMTS9, aunque no fue una asociación estadísticamente significativa (198). Helisami y colaboradores encontraron asociación entre el alelo de riesgo T de rs 6795735 y la DMAE tras realizar un estudio multicéntrico en una cohorte de Finlandia (199).

1.7.1.1.5.2. Gen de la cadena alfa 1 del colágeno tipo VIII y gen de la filamina A que interactúa con la proteína 1 (*COL8A1L/FILIP1L*)

Otra de las nuevas variantes génicas asociadas a la DMAE se ha relacionado con los genes *COL8A1L/FILIP1L* (193, 200), en concreto en el SNP rs13095226 localizado en el cromosoma 3. Por un lado, el gen *COL8A1L* codifica la cadena de colágeno α -1, una de las dos cadenas α del colágeno tipo VIII. El colágeno tipo VIII es un colágeno de cadena corta no fibrilar que existe como heterodímero compuesto de dos cadenas α distintas (*COL8A1* y *COL8A2*). Es uno de los

principales componentes de las membranas oculares, incluida la membrana de Bruch (201). Aunque se desconoce su función, se ha mostrado que participa en la aterogénesis y remodelado vascular, presumiblemente modificando la migración celular y la proliferación (202). Además, parece que juega un papel importante en la angiogénesis, ya que se ha detectado en las fases de desarrollo de los hemangiomas. Se ha postulado que este colágeno, que se produce tempranamente en el desarrollo de los nuevos vasos, produce un sustrato que facilita la migración de las células endoteliales y la deposición de otros componentes extracelulares e influye en el movimiento celular y el mantenimiento de la integridad de los vasos (203). Por tanto, el COL8A1 podría actuar como factor angiogénico en el proceso de neovascularización que caracteriza a la DMAE exudativa.

Por otro lado, el gen *FILIP1L* (*filamin A interacting protein 1-like*; sinónimo del gen *down-regulated in ovarian cancer 1*, DOC1) también parece intervenir en el proceso angiogénico al actuar como un regulador de la actividad antiangiogénica de las células endoteliales. Cuando se sobreexpresa en células endoteliales lleva a la inhibición de la proliferación y migración celular y al incremento de la apoptosis (204).

En estudios recientes se ha comprobado que *FILIP1L* inhibe el crecimiento tumoral al inhibir la expresión de la proteína MMP9, que a su vez inhibe la liberación de VEGF desde la matriz extracelular, mostrando actividad antiangiogénica (205). Su posible asociación con la DMAE todavía no ha sido estudiada.

1.7.1.1.5.3. Gen del receptor tipo 1 del factor de crecimiento transformante β (*TGFR1*)

Otro gen implicado al proceso angiogénico es el gen *TGFR1* (receptor tipo 1 del TGF- β). Las proteínas MMP2 y MMP9, así como la trombospondina 1, son algunas de las proteínas que activan el TGF β (206), permitiendo así su unión a los dominios extracelulares tipo I y II del *TGFR1*, induciendo un cambio conformacional que facilita la fosforilación y la activación del mismo. La activación de *TGFR1* conlleva la propagación de la señal a través de dos rutas diferentes: la ruta canónica, dependiente de las proteínas SMAD (proteínas encargadas de la propagación de la señal) y la ruta no-canónica, independiente de SMAD. En la ruta

no-canónica, el complejo del receptor activado transmite la señal a través de otros factores como la proteína cinasa activada por el mitógeno p38 (p38 MAPK). La inhibición de la actividad p38 MAPK aumenta la angiogénesis inducida por VEGF mientras que los inhibidores de la p38 MAPK promueven la permeabilidad vascular inducida por VEGF, un importante doble papel de la ruta p38 MAPK que es relevante en la terapia contra la angiogénesis (207).

La existencia de TGF β en las células mesenquimales del EPR y su activación en el daño tisular retiniano se ha demostrado en modelos experimentales. La inactivación del receptor TGFBR1 mediante inhibidores de tipo proteín-cinasa podría ser uno de los objetivos de tratamiento de la DMAE (208).

1.7.1.1.5.4. Gen de la proteína RAD 51B (*RAD51B*)

El estrés oxidativo conlleva daño en el ADN y se produce fundamentalmente como consecuencia del envejecimiento. La retina y en particular, la mácula, son estructuras que precisan elevados niveles de oxígeno.

La exposición prolongada a la irradiación, y la continua fagocitosis de fotorreceptores (209) provocan estrés oxidativo y daño al ADN, que parece contribuir significativamente a la DMAE. En este contexto, uno de los nuevos genes de susceptibilidad asociados con la DMAE es el gen *RAD51B* (193, 200, 210), que codifica a la proteína RAD51B y está implicada en la reparación del ADN, en concreto, de la ruptura de la doble cadena del ADN por recombinación homóloga al promover la actividad de la recombinasa central RAD51 (211). Este papel de reparación de daño del ADN en circunstancias de elevada concentración de especies reactivas de oxígeno, como ocurre durante la patogénesis de la DMAE, conlleva que la presencia de una variante genética en esta proteína pueda estar relacionada con la susceptibilidad genética a padecer DMAE.

Se han identificado tres SNPs de *RAD51B* asociados a DMAE. Seddon y colaboradores encontraron una asociación positiva en el SNP rs8017304 (A>G), señalando a este polimorfismo junto con *CFH* y *COL8A1* como un posible biomarcador de riesgo de DMAE (187). Los otros dos polimorfismos de *RAD51B*, descritos por Chu y colaboradores en dos cohortes, una caucásica y otra china, son

rs17105278 T>C y rs4092566 C>T. La aparición combinada de estas alteraciones genéticas provoca una disminución en la transcripción de *RAD51B* y con ello un fallo en la reparación del ADN (212).

1.7.2. Farmacogenética y DMAE

La influencia genética en la respuesta al tratamiento antiangiogénico es también objeto de estudio en relación con los polimorfismos de riesgo de los genes del factor H y del factor 3 del complemento, los genes *ARMS2/HTRA1*, los genes codificantes de VEGF-A y su receptor.

1.7.2.1. Polimorfismos del gen del Factor H del complemento

Con respecto a la terapia con bevacizumab, los estudios realizados por Brantley y colaboradores en 2007 (213) y por Nischler y colaboradores en 2011 (214) revelaron que existe una correlación entre el genotipo *CFH* de pacientes con NVC y la eficacia de las inyecciones intravítreas de este tratamiento antiangiogénico.

En ambos estudios se observó que al finalizar la terapia los pacientes homocigotos para el alelo CC tenían peores resultados, en cuanto a agudeza visual, que los homocigotos TT y los heterocigotos TC.

La posible relación entre estas variantes genéticas y la respuesta a la terapia con ranibizumab es también objeto de estudios farmacogenómicos. En el estudio de Orlin y colaboradores no se encontró asociación entre el genotipo *CFH* y la respuesta al agente antiangiogénico (215). Sin embargo, en el estudio de Lee y colaboradores del año 2008 (159), se observó que los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo 402H requirieron más inyecciones de ranibizumab. Teper y colaboradores encontraron que la variante Y402H repercute en una peor respuesta a ranibizumab pero observan mayor ganancia de agudeza visual en los homocigotos CC (216). El metaanálisis de Chen y colaboradores del año 2012 (217) mostró que, además de relacionarse el gen *CFH* con la susceptibilidad genética de padecer DMAE, seis de cada diez estudios mostraban al alelo C como predictor de mala respuesta al tratamiento anti-VEGF. Los pacientes que presentan el alelo T en

el gen de *CFH* Y402 tienen mejor respuesta al tratamiento que los homocigotos CC para este gen.

1.7.2.2. Polimorfismos en el del factor 3 del complemento (C3)

Los genes *CFH* y *C3* son genes de componentes implicados en la cascada del complemento. La alteración del sistema del complemento por algún polimorfismo genético desempeña claramente un papel importante en la patogénesis de la DMAE (159). Aunque los polimorfismos del gen *C3* se han relacionado con la DMAE exudativa no se dispone de la misma evidencia científica que para los polimorfismos del gen *CFH*.

Hagstrom y colaboradores, basándose en el estudio CATT, encontraron que los pacientes que presentaban el genotipo GG del SNP rs2230199 de *C3* presentaron mejor respuesta al tratamiento anti-VEGF (162). A pesar de esto, no se puede considerar un biomarcador farmacogenético en esta enfermedad.

1.7.2.3. Polimorfismos en el gen *ARMS2/HTRA1*

La variante *ARMS2* A69S no parece influir en la respuesta al agente antiangiogénico, aunque los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo (TT) presentan lesiones neovasculares de mayor tamaño que los homocigotos GG y los heterocigotos GT (213). Los resultados respecto a la influencia del genotipo *ARMS2* sobre la respuesta a ranibizumab son discordantes. El estudio de Teper y colaboradores mostró la correlación de la variante genética con la eficacia del anti-VEGF inyectado según el protocolo SUSTAIN y reveló que los pacientes homocigotos para la variante 69S no mejoran su agudeza visual a pesar del descenso en el grosor central retiniano determinado por OCT (216). Sin embargo, en otro estudio retrospectivo no se encontró asociación entre las variantes de *ARMS2* y la respuesta a la terapia antiangiogénica (218). Hangstrom y colaboradores tampoco encontraron asociación (162) entre los alelos de riesgo de *ARMS2/HTRA1* y la respuesta a ranibizumab o bevacizumab.

1.7.2.4. Polimorfismos en el gen VEGF-A

La diana terapéutica para frenar la NVC producida en la DMAE húmeda es la inhibición del VEGF. Por ello, muchos estudios de farmacogenética se han centrado en el análisis de las posibles variantes genéticas de esta molécula y su relación con la respuesta al tratamiento antiangiogénico.

Así, diversos estudios han tratado de asociar la respuesta al tratamiento anti-VEGF con los SNPs en el gen codificante de VEGF-A. La mayoría han demostrado que la presencia de alelos de riesgo en el gen *VEGF-A*, sobre todo combinados con alelos de riesgo en los genes de *CFH* y *ARMS2*, está relacionada con una peor respuesta a tratamientos antiangiogénicos y con una conversión más temprana de la DMAE hacia formas neovasculares (219). Estudios realizados por Agosta y colaboradores (220), Francis y colaboradores (221) y Smith y colaboradores (222) proponen el genotipo GG del rs833069 y el genotipo AA del rs833068 como marcadores de buena respuesta al tratamiento. Li y colaboradores añaden el genotipo TT del rs3025039, aunque sólo se ha podido relacionar en población asiática (223).

Cabe destacar el estudio llevado a cabo en población española por el grupo de Cruz-González en el año 2014, que encontró diferencias estadísticamente significativas para el genotipo CC de rs833061 de *VEGF-A* como protector de DMAE, provocando una mejor AV tras el tratamiento con ranibizumab intravítreo. También se observó mejoría significativa en la AV de los pacientes con genotipo AA del rs699947 (224). Los criterios sugeridos como “de buena respuesta al tratamiento” para estos autores son tres: la mejoría subjetiva de AV percibida por el paciente, la ganancia de AV de al menos 5 líneas en la escala EDTRS con respecto a la AV presentada al inicio del tratamiento y la reducción de al menos 100 micras en el grosor macular central medido con OCT en comparación con el grosor macular presentado al inicio del tratamiento.

1.7.2.5. Polimorfismos en el gen VEGFR2

Las variaciones genéticas del gen del receptor de VEGF-A pueden estar asociadas con la respuesta al tratamiento anti-VEGF en la DMAE exudativa. Sin embargo, son pocos los estudios realizados y con resultados discordantes.

Para Hermann y colaboradores existen dos polimorfismos en el gen de *VEGFR2* asociados con la respuesta a ranibizumab intravítreo: rs4576072 y rs682477. Estos dos SNPs han sido asociados, de forma independiente, con una mejoría en la agudeza visual de entre 1 y 3 líneas en la escala de Snellen tras un año de tratamiento (225).

Hangstrom y colaboradores no encontraron asociación entre los SNP rs4576072 y rs682477 y un mayor riesgo de padecer DMAE, por lo que cuestionan a los polimorfismos en el gen *VEGFR2* como biomarcadores predictores en la respuesta de los pacientes con NVC en el tratamiento antiangiogénico (226).

1.7.2.6. Polimorfismos en el gen *ApoE*

Algunos alelos del gen de la apolipoproteína E también se han vinculado a la respuesta al tratamiento antiangiogénico en la DMAE exudativa. Aunque son pocos los estudios realizados merece mención el trabajo de Wickremasinghe y colaboradores, que encontraron una mejor respuesta terapéutica en los pacientes portadores del alelo *ApoE4* frente a los portadores del alelo *ApoE2* (227). Recientemente, en junio de 2016, se ha publicado otro estudio que demuestra también la asociación positiva entre *ApoE4* y la buena respuesta al tratamiento antiangiogénico (228).

II - JUSTIFICACIÓN

II - JUSTIFICACIÓN

La degeneración macular es una enfermedad que causa una pérdida de visión muy incapacitante para el paciente. El tratamiento con inyecciones intravítreas de ranibizumab ha revolucionado el abordaje de esta enfermedad. El manejo terapéutico de la DMAE conlleva unos problemas como son la necesaria administración mensual de una inyección de este fármaco en la fase de carga (por lo menos tres dosis) y con frecuencia la continuación de esta pauta mensual en la fase de mantenimiento. Además, este tratamiento genera unos costes elevados para los servicios de salud tanto por precio del fármaco como por la necesidad de realizar este tipo de intervención en quirófano bajo condiciones de asepsia para prevenir la principal y más temida complicación de la inyección intravítrea que es la infección del globo ocular o endoftalmitis. A esto hay que añadir las molestias para los pacientes, sobre todo de edades avanzadas, que tienen que desplazarse periódicamente a los centros especializados para el tratamiento y el seguimiento de su enfermedad. Finalmente, los resultados de la terapia antiangiogénica no son grandes ni esperanzadores para los enfermos de DMAE.

La variación en la respuesta individual a un fármaco es un fenómeno común que se aborda individualizando el tratamiento o régimen de dosificación en muchas enfermedades. En la DMAE, esta respuesta puede estar influenciada por diversos factores: edad de presentación, dieta, factores ambientales, tipo y tamaño de las lesiones neovasculares, estímulos para la expresión del VEGF y/o factores angiogénicos y antiangiogénicos adicionales y factores genéticos.

Tomando como base que la DMAE es una enfermedad con una gran carga genética, se pretende encontrar algún marcador farmacogenético que se asocie a una mejor respuesta al tratamiento a ranibizumab intravítreo.

III - HIPÓTESIS

III - HIPÓTESIS

La hipótesis de trabajo es que los polimorfismos de secuencia en genes que influyen en la angiogénesis como *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y en el estrés oxidativo como *RAD51B* (rs8017304) podrían estar implicados en la respuesta interindividual al fármaco anti-VEGF ranibizumab, y, por tanto, ser biomarcadores farmacogenéticos que podrían predecir la respuesta a esta terapia. De este modo, será posible conocer la efectividad del tratamiento para cada caso y ajustar la dosis en función del perfil genético del paciente.

Este tipo de estudios genéticos de predicción de respuesta a tratamiento son necesarios por la escasez de publicaciones existentes y los resultados contradictorios que arrojan.

IV - OBJETIVOS

IV - OBJETIVOS

El objetivo principal es:

- Conseguir un marcador farmacogenético que permita predecir la respuesta que tendrá el paciente a la terapia intravítrea con el agente anti-VEGF ranibizumab para reducir costes y evitar someter al paciente a un régimen de inyecciones que pueda ser ineficaz.

Los objetivos secundarios son:

- Analizar los polimorfismos de secuencia en los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304) por su posible papel en la susceptibilidad a padecer DMAE en nuestra población.
- Examinar si la presencia de polimorfismos de secuencia en los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304) tiene influencia en la respuesta a tratamiento con ranibizumab intravítreo en pacientes con formas exudativas de DMAE.
- Demostrar si existe algún tipo de relación entre la respuesta a tratamiento (mejoría de AV, reducción en el espesor macular, el número de inyecciones que reciben los pacientes) y las variantes alélicas en los polimorfismos estudiados.
- Determinar la existencia de una fecha crítica para predecir la respuesta a ranibizumab sin necesidad de prologar tratamientos innecesarios.
- Valorar si los polimorfismos de secuencia en los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304) en pacientes afectados de DMAE están asociados con otros factores como la edad, el sexo, la diabetes, la hipertensión o la enfermedad cardiovascular.

- Evaluar si hay relación entre alguno de estos cuatro polimorfismos y los antecedentes familiares de DMAE.
- Estudiar si existe relación entre alguno de los cuatro polimorfismos y la presencia de DMAE neovascular en pacientes intervenidos de catarata en el ojo afectado.

**V - MATERIAL Y
MÉTODO**

V - MATERIAL Y MÉTODO

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, retrospectivo, analítico con valoración transversal para evaluar la presencia de los polimorfismos de secuencia en los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs 6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304) y la respuesta o no repuesta al tratamiento con antiangiogénico ranibizumab (Lucentis®, Novartis, Basilea, Suiza).

5.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Se han incluido en el estudio todos los pacientes diagnosticados de DMAE húmeda con neovascularización coroidea activa pertenecientes a la unidad de retina médica del servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario Universitario de Cartagena (CHUC). Este centro pertenece a la red pública de hospitales y es centro de referencia del área 2 de salud de la Región de Murcia, atendiendo una población de 267.000 pacientes.

En el estudio fueron incluidos un total de 125 pacientes con neovascularización coroidea que iban a recibir o habían iniciado terapia antiangiogénica con inyección de ranibizumab intravítreo. El período del estudio estuvo comprendido entre octubre de 2014 y marzo de 2016. Adicionalmente se incluyeron 125 pacientes controles (donantes de sangre de raza caucásica de la misma área de salud) con una media de edad de 52,4 años y una distribución por sexo de 46,9% de varones y de 53,1% de mujeres.

Hay que destacar que debido a que el estudio implica la utilización de tejido humano, el uso de datos personales e información genética, se autorizó por el Comité de Ética de la Universidad Católica de Murcia (UCAM) así como por el Comité de Ética del CHUC.

Además, la investigación cumplió los principios éticos de respeto a la dignidad humana, confidencialidad y proporcionalidad entre los riesgos y los beneficios esperados, disponiendo además del consentimiento informado y escrito de las personas implicadas o sus representantes legales en este estudio, según las normas deontológicas reconocidas por la declaración de Helsinki (revisión de Hong-Kong, Septiembre de 1989).

5.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN DE LOS PACIENTES

La participación en el estudio fue voluntaria. Previa a la inclusión en el estudio, los pacientes firmaron y autorizaron mediante documento de consentimiento informado la autorización para inyección de tratamiento intravítreo (anexo 1) y de autorización de utilización de datos clínicos y de material biológico excedente del proceso asistencial para investigación biomédica y conservación en biobanco de acuerdo con la Ley de Investigación Biomédica del 4 de julio de 2007 (anexo 2). En este documento el paciente es informado del objetivo del trabajo y acepta participar libremente.

Criterios de inclusión:

Pacientes de cualquier edad, raza y sexo procedentes del servicio de Oftalmología del CHUC que fueron diagnosticados de NVC activa y que iban a recibir o estaban recibiendo terapia antiangiogénica intravítrea y que libre y voluntariamente decidieron incluirse en el estudio.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que presentasen formas de DMAE atroficas.
- Pacientes que no autorizasen su inclusión en el estudio.

- Pacientes que rechazasen ser tratados.
- Pacientes con NVC que recibiesen tratamiento diferente a terapia antiangiogénica con ranibizumab intravítreo.
- Pacientes que presentasen enfermedad macular o retiniana que alterase la evolución de la DMAE.
- Pacientes a los que no se les pudiese realizar en la consulta las pruebas requeridas.
- Pacientes que no pudiesen ser desplazados a la consulta de Oftalmología.
- Pacientes que presentasen opacidades de medios que imposibilitase la realización de examen de fondo de ojo y de OCT.

5.4. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

La recogida de datos se registró en una hoja de recogida de datos (anexo 3) revisando las historias clínicas de los pacientes introducidos en el estudio. Los datos que se recogieron fueron los siguientes:

- Datos de filiación: nombre, sexo, número de historia clínica, año de nacimiento, edad.
- Antecedentes familiares de DMAE.
- Antecedentes personales de patología concomitante: DM, HTA, HCL, enfermedad cardiovascular (ECV).
- Antecedentes de enfermedad ocular.
- Patología ocular asociada.
- Examen de AV al inicio, a los tres meses, a los seis meses y al año del tratamiento.
- Biomicroscopía de polo anterior con lámpara de hendidura.
- Toma de presión intraocular (PIO) con tonómetro de Goldman medida en milímetros de mercurio (mmHg).
- Datos del fondo de ojo.
- Datos de la OCT: grosor macular medido en micras, presencia o ausencia de membrana neovascular coroidea y presencia o ausencia de líquido subretiniano. Estas tres medidas se tomaron al inicio, a los 3 meses, a los seis meses y a los doce meses del tratamiento.

- Número de inyecciones intravítreas durante un año de seguimiento.

Para la valoración de la evolución de la enfermedad en pacientes diagnosticados con DMAE húmeda o exudativa, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: prueba de agudeza visual, examen del fondo de ojo y examen de las estructuras retinianas *in vivo* mediante la OCT antes y después del tratamiento con ranibizumab.

5.4.1. Determinación de agudeza visual

La AV se define como el objeto más pequeño que una persona puede ver a una distancia determinada. Esta medición se expresa como una fracción, donde el numerador es la distancia a la que se examina y el denominador la distancia a la cual una persona normal puede ver ese objeto.

Por razones ópticas se examina a 6 metros de distancia de la carta de símbolos u optotipos. Esto no se lleva a cabo a distancias mayores ya que no es práctico y porque 6 metros es la distancia menor que puede considerarse como infinito óptico, a distancias menores interviene el fenómeno de la acomodación (229).

La determinación de la AV en nuestro estudio se llevó a cabo empleando pruebas de visión estándar mediante un proyector de cartas de optotipos (test de Snellen).

Durante el examen de la AV lejana se situó al paciente a una distancia de 3 metros, con la cabeza a la altura de una cartilla correspondiente bien iluminada. El paciente empleó su corrección óptica para la visión lejana. Se ocluyó completamente el ojo contralateral para determinar la AV unilateral con la mejor corrección óptica, repitiendo el mismo procedimiento para el otro ojo y anotando en cada caso la AV obtenida. Además de la AV con la corrección, debe determinarse ésta con la colocación de un agujero estenoico.

La prueba a través de un agujero estenoico (Fig. 24) consiste en hacer que el paciente mire a través de un pequeño agujero de 1,5 mm, hecho en el centro de un medio opaco. De esta forma se consigue mejorar la visión en casos de defectos

de refracción inadecuadamente corregidos, puesto que el agujero estenoico únicamente deja pasar a su través los rayos que no sufren refracción alguna y bloquea el resto de los rayos.



Figura 24: Máscara oclusora con agujero estenoico empleada en la consulta (FOTO DE AUTOR)

Tras este examen se registró la letra más pequeña que el paciente podía ver y se anotó como AV máxima corregida. Este dato se registró al inicio del tratamiento, a los tres meses, tras 6 meses y tras 12 meses de iniciado el tratamiento.

Cuando el paciente no pueda leer la letra más grande de la cartilla empleada (por debajo de 0,05) no hay expresión numérica de la AV, por lo que en estos casos debe buscarse algún método repetible. Para ello, se intenta que el paciente vea las manos del examinador y cuente los dedos acercándose gradualmente a él, en estos casos se anota la distancia a la que lo hizo (por ejemplo, OD: cuenta dedos (CD) a 1 m y OI: cuenta dedos a 50 cm). Si el sujeto no es capaz de contar los dedos de la mano, se evalúa si puede detectar los movimientos de las manos (MM) y la distancia a la que lo hace. Si esto no es posible, se determina si el ojo examinado puede percibir la existencia de una fuente luminosa y proyectar la procedencia del estímulo luminoso (PL).

En nuestro caso, para poder realizar un análisis numérico posterior de la AV se realizó la siguiente conversión numérica de acuerdo a los baremos establecidos por la OMS para baja agudeza visual (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla para conversión numérica de valores de AV adaptada según baremo de baja AV de la OMS .

<i>AV ORIGINAL</i>	<i>AV CODIFICADA</i>
CD 1 M	0,02
CD 50 CM	0,015
MM	0,01
PL	0,005

5.4.2. Examen ocular

Seguidamente, se realizó un examen ocular en la lámpara de hendidura valorando estado del polo anterior del ojo.

En el polo anterior del ojo se visualizan estructuras como son la córnea y el cristalino y valoramos la existencia o no de catarata, así como el grado de severidad de ésta: esclerosis de cristalino, catarata cortical o nuclear.

En esta parte del examen se toma la PIO con el tonómetro de Goldman integrado en la lámpara de hendidura. La presión intraocular se mide en mmHg siendo las medidas normales entre 10 y 21 mmHg.

Por último, se realiza examen indirecto de fondo de ojo con lente de exploración de 78 ó de 90 dioptrías (*Volk Optical Inc, Mentor, EEUU*) bajo midriasis farmacológica con colirio de tropicamida 0,5% (*Alcon Laboratories Inc, Forth Worth, EEUU*). En este punto, en el fondo del ojo afectado se valora la existencia de:

- Drusas.
- Membrana neovascular evidente.
- Hemorragia retiniana en el área macular.
- Cicatriz o fibrosis coriorretiniana en las revisiones a partir de los 3 meses.

5.4.3. Realización de OCT

Tras examinar oftalmoscópicamente el área macular, se procedió a la evaluación con la tomografía de coherencia óptica (modelo Cirrus™ HD-OCT, Carl Zeiss, Meditec, Dublin, CA, EEUU) (Fig. 25).

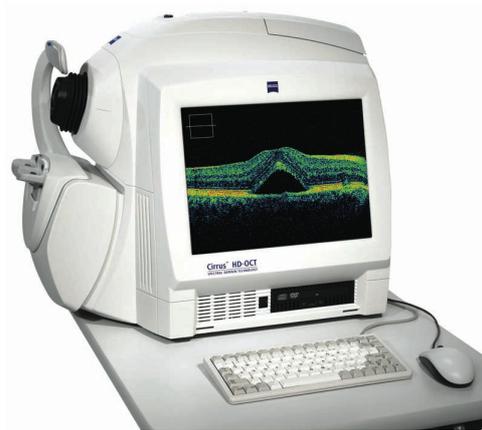


Figura 25. Imagen de Cirrus HD-OCT empleada en nuestro estudio (FOTO DE AUTOR).

La adquisición de cada tomografía se realizó en tres pasos: 1) seleccionar la imagen (mediante un barrido o escaneo del polo posterior), 2) congelar la misma y 3) guardarla para su análisis posterior.

Para asegurar una correcta fijación del paciente, se le pide que determine en el objetivo si el punto de intersección de las líneas rojas de la tomografía, coincide con el centro de la tarjeta verde de fijación. Si es así, no es necesario un ajuste posterior.

Si no consigue ver el punto de intersección de los cortes radiales rojos, se le pide que mire al centro de la tarjeta de fijación verde, y el explorador ajusta el punto de intersección para hacerlo coincidir con el centro de la tarjeta de fijación verde.

Si el paciente tampoco puede ver el centro de la tarjeta de fijación verde, se le pide que mire de frente y es el explorador el que intenta hacer coincidir el punto de intersección de los cortes radiales con el centro de la mácula.

El protocolo de exploración empleado fue el *macular cube 512x128*. Este programa realiza 512 cortes *B-scans* (axiales) con 128 *A-scans* (verticales) por cada corte sobre un área macular central de 6x6 mm. Posteriormente, el programa nos ofrece un mapa de espesores con sectores concéntricos que conforman las nueve regiones del mapa macular de ETDRS (230) (Fig. 26). El espesor medio de todos los puntos dentro del círculo interno de 1 mm de diámetro se define como el espesor central de la retina (*central subfield thickness, CST*). El volumen del cubo (*cube volumen, CV*) y el espesor medio del cubo (*cube average thickness, CAT*) son generados por algoritmos internos de Cirrus que comparan el estudio realizado al paciente con el estudio macular normal.

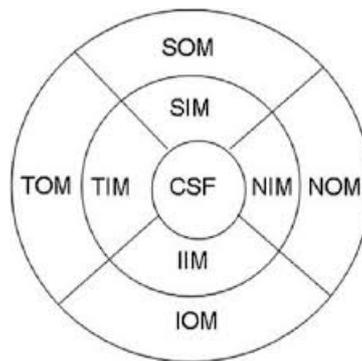


Figura 26. Diagrama con las 9 regiones del mapa macular ETDRS. Los círculos concéntricos son de 1 mm, 3 mm y 6 mm de diámetro. CST: central subfield thickness; IIM: inferior inner macula; IOM: inferior outer macula; NIM: nasal inner macula; NOM: nasal outer macula; SIM: superior inner macula; SOM: superior outer macula; TIM: temporal inner macula; TOM: temporal outer macula (230).

En nuestro estudio con la realización de la OCT se constató la evidencia de NVC mediante:

- Signos directos de NVC: existencia de lesión nodular o fusiforme (neovascularización coroidea clásica).
- Signos indirectos de NVC: existencia de alteración de la arquitectura retiniana con evidencias o sospechas de edema como quistes intrarretinianos y desprendimiento del epitelio pigmentario y/o del neuroepitelio.

En este punto se extrajeron los siguientes datos:

- Presencia o no de neovascularización coroidea.
- Medida en micras del espesor retiniano desde EPR hasta la altura máxima en el área macular central.
- Presencia o ausencia de líquido subretiniano.
- Presencia de fibrosis macular a partir de los 3 meses de inicio del tratamiento.

Las medias de espesor de la fovea central medidas por OCT se determinaron en el momento del diagnóstico, a los tres (final de la dosis de carga de tres inyecciones mensuales), a los seis y a los doce meses del inicio del tratamiento intravítreo con ranibizumab.

En los pacientes que presentaban la enfermedad de forma bilateral se incluyó el ojo que presentaba mejor agudeza visual dentro del estudio.

5.4.4. Inyección de ranibizumab intravítreo

La inyección de ranibizumab intravítreo se llevó a cabo en todos los pacientes en el quirófano de Oftalmología del Hospital General Universitario de Santa Lucía, tras informar a los pacientes y firmar el consentimiento de terapia antiangiogénica intravítrea en la consulta.

Bajo anestesia tópica con gotas de colirio anestésico doble (*Alcon Laboratories Inc*, Forth Worth, EEUU) y en condiciones de asepsia, aplicando solución de povidona yodada en piel de la región palpebral y diluida en la superficie ocular y material estéril, se aplicó una hemosteta empapada en lidocaína al 2% (*Braun Medical S.A.*, Barcelona, España) sobre la conjuntiva de la zona a inyectar durante unos segundos.

Se inyectan 0,5 mg/0,05 mL de ranibizumab intravítreo en la región escleral del ojo afectado de NVC a 3,5-4 mm por detrás de limbo según si el paciente es pseudofáquico o fáquico con una aguja de calibre 30 G (*Sterican®*, *Braun Medical S.A.*, Barcelona, España) comprimiendo con una hemosteta seca la zona de la inyección para evitar reflujo. Posteriormente se aplica una gota de colirio de

tobramicina al 0,3% (Tobrex®, Alcon Laboratories Inc, Forth Worth, EEUU) la cual se mantiene durante 10 días de tratamiento domiciliario con posología de 4 veces al día.

En todos los pacientes se realizó dosis de carga de tres inyecciones mensuales de ranibizumab intravítreo con revisión posterior a la última inyección. La indicaciones de retratamiento fueron según pauta PRN descrita en el estudio SUSTAIN (111) modificando el criterio de pérdida de AV de 5 letras de escala EDTRS a pérdida de una línea de agudeza visual en escala de Snellen respecto a la visita previa o en los siguientes criterios tomográficos:

- No desaparición de la membrana
- No desaparición del líquido subretiniano
- Aumento de grosor macular de 100 μm respecto al examen previo

En este punto, recogimos como dato el número de inyecciones que recibió el paciente a lo largo del año de seguimiento.

5.4.5. Evaluación de la respuesta al tratamiento con ranibizumab

Los pacientes son evaluados de la respuesta al tratamiento al finalizar la dosis de carga. Como parámetros de respuesta al tratamiento consideramos la mejoría en la agudeza visual y la desaparición de los signos de exudación macular (hemorragia macular, edema macular, desprendimiento de EPR).

En nuestro estudio consideramos pacientes respondedores al tratamiento aquellos que presentaron ganancia de AV de al menos una línea en el test de Snellen y con reducción de espesor macular de al menos 100 μm medida con OCT (Fig. 27).

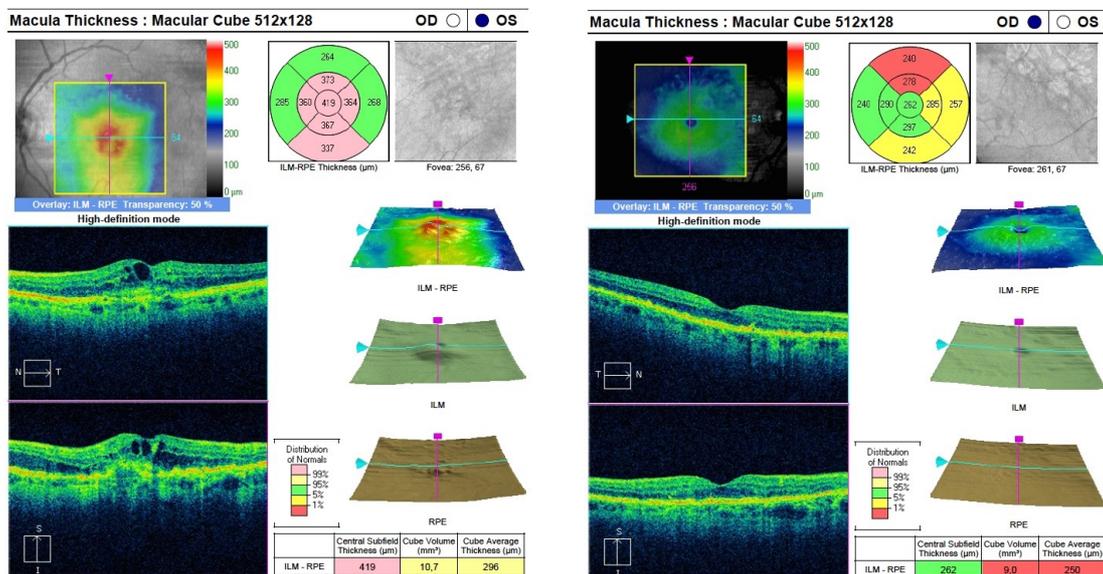


Figura 27. OCT de paciente incluido en el estudio con buena respuesta a tratamiento con ranibizumab intravítreo. En la OCT inicial (imagen de la izquierda) observamos el engrosamiento en el EPR (NCV) acompañado de edema macular con quistes intrarretinianos. En la OCT final (imagen de la derecha) podemos observar la desaparición de la NVC y del edema macular asociado con restauración de la arquitectura foveal normal (FOTO DE AUTOR).

Se consideran pacientes no respondedores aquellos pacientes que no han presentado mejoría en su agudeza visual y en los que persiste exudación macular, o no ha habido reducción significativa, tanto a nivel clínico como en la OCT (Fig. 28).

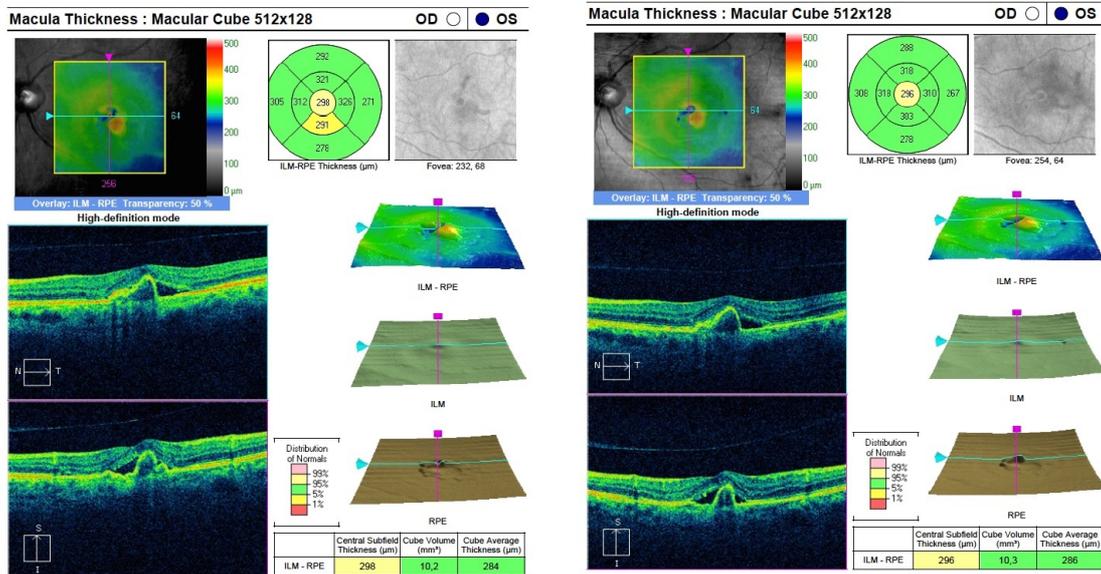


Figura 28. OCT de paciente incluido en el estudio con mala respuesta a tratamiento con ranibizumab intravítreo. En la OCT inicial (imagen de la izquierda) se observa un desprendimiento de epitelio pigmentario con fluido intrarretiniano adyacente. En la OCT final (imagen de la derecha) vemos que el aspecto es prácticamente similar tras el tratamiento con ranibizumab intravítreo (FOTO DE AUTOR).

5.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

5.5.1. Extracción y cuantificación del ADN de las muestras

La recogida de células de mucosa bucal se realizó mediante un escobillón estéril en el momento previo a la inyección de ranibizumab intravítreo en quirófano previa firma del modelo de consentimiento informado. Las muestras extraídas se prepararon para ser conservadas en el Nodo 2 de la Red Regional de Biobancos (Biobanc MUR).

Las células de la mucosa se resuspendieron en suero salino mediante agitación para posteriormente ser centrifugadas y conservadas en un volumen de 200 μl en un arcón con control de temperatura a -80 °C en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Santa Lucía a la espera de su procesamiento posterior.

El procedimiento de extracción y manejo de ADN se realizó en el laboratorio de diagnóstico molecular del Hospital General Universitario de Santa Lucía.

La extracción de ADN de las células de la mucosa bucal se realizó empleando el kit comercial de extracción de ADN genómico en columna de Qiagen QiAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) en el equipo automatizado Qiacube (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo de suspensión celular indicado por el fabricante.

Las cuantificaciones se realizaron mediante espectrofotometría de absorción molecular en el espectro ultravioleta utilizando el espectrofotómetro Nanodrop de Thermo Scientific™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU) y agua destilada como calibrador. Esta cuantificación por espectrofotometría está basada en la propiedad de las bases púricas y pirimidínicas de ADN de absorber luz con un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm. Una unidad de absorbancia de 260 nm corresponde a una concentración de ADN de 50 mg/ml.

Una vez cuantificado y dada la baja concentración de ADN en las muestras, el ADN extraído se amplificó con el kit Genomiphi (*General Electric Healthcare Life Sciences*, Fairfield, EEUU) para incrementar la concentración. Un vez amplificado, se procedió a la cuantificación mediante espectrofotometría de absorción en el espectrofotómetro Nanodrop obteniéndose una concentración media final de 1027,96 ng/ μ l.

Conocida la concentración de ADN, se distribuyeron las muestras en placas de 96 pocillos a una concentración de 20 ng/ μ l correctamente identificadas y se almacenaron a -20°C hasta la realización de los análisis.

5.5.2. Estudio de variantes genéticas

Los polimorfismos en los genes de estudio (*ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304)) se determinaron por discriminación de alelos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) usando las sondas KASPar SNP Genotyping System (LGC,

Middlesex, UK) para cada gen. Para ello, en primer lugar se obtuvo la secuencia flanqueante de cada polimorfismo en la base de datos de SNPs del Centro Nacional de Investigación en Biotecnología (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). De este modo, se pudo diseñar los cebadores y sondas que permitieron la detección de los polimorfismos de estudio.

El sistema de genotipado de SNPs KASPar se basa en discriminación alélica empleando sondas fluorescentes. Este ensayo es capaz de discriminar los dos alelos de un SNP en un locus específico a partir de ADN genómico mediante PCR alelo específica competitiva. Este ensayo utiliza una Taq-polimerasa modificada sin actividad 3'-5' exonucleasa. Se basa en el empleo de cebadores que generan productos de PCR fluorescentes que permiten genotipar el SNP en un único paso. Este sistema de genotipado utiliza la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y está diseñado como un ensayo múltiple que detecta ambos alelos en un único turno de reacción con tres cebadores específicos para el SNP sin marcar y dos cebadores universales marcados con los fluorocromos FAM o VIC. Estos últimos cebadores, si se unen al ADN molde, adoptan una estructura de horquilla en donde la molécula de fluorocromo se encuentra muy próxima a un apantallador que le impide la emisión de fluorescencia. En cambio, cuando son complementarios al ADN molde, la estructura de la horquilla se rompe emitiendo fluorescencia la cual es captada por el termociclador a tiempo real ABI 7900HT de Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU) (Fig. 29).

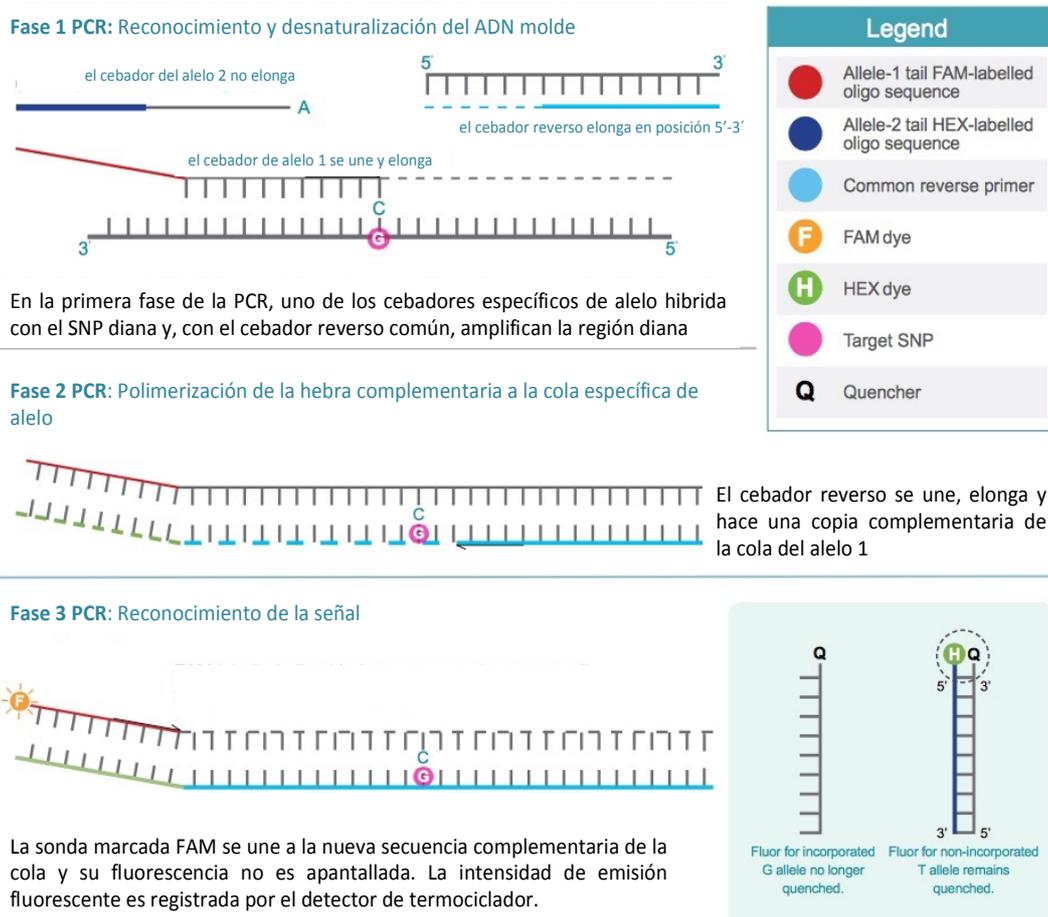


Figura 29. Genotipado de SNPs KASPar con sondas fluorescentes (extraído de <http://www.lgcgrop.com>)

La preparación de la mezcla para la reacción de PCR se realizó incorporando en una placa de 96 pocillos con un volumen total de 8µl los siguientes elementos según protocolo húmedo: 0,11µl de la mezcla de ensayo que incluye cebadores y sondas fluorescentes específicas de alelo, 4 µl de mezcla maestra 2x KASPar Master Mix, 0,064 µl de MgCl₂ (50 mM) y 4 µL ADN. La master mix consta de buffer, polimerasa y desoxinucleótidos trifosfatos.

Las condiciones de termociclado de la PCR fueron las siguientes (Fig. 30):

1°. Un tratamiento a 94°C durante 15 minutos con el fin de activar la actividad polimerasa tipo "Hot Start".

2°. Una serie de 36 ciclos que consistente en un paso a 94°C durante 20 segundos que permite la desnaturalización del ADN y en un paso un minuto de duración y temperatura variable en la que ocurre el anillamiento o hibridación de los cebadores y la reacción de polimerización. Los 10 primeros ciclos de esta serie incluyen los pasos a temperatura variable o protocolo "touchdown" (Fig. 31) que, en función de los polimorfismos a determinar tuvieron las siguientes características:

- Protocolo "touchdown" de 68 a 62°C: 10 ciclos de 20 segundos a 94°C y 68°C bajando 0,6°C por ciclo hasta llegar a 62°C seguidos de 26 ciclos de 94°C de 10 segundos y 62°C de un minuto.
- Protocolo "touchdown" de 61 a 55°C: 10 ciclos de 20 segundos a 94°C y 61°C bajando 0,6°C por ciclo hasta llegar a 55°C seguidos de 26 ciclos de 94°C de 10 segundos y 55°C de un minuto (Tabla 2).

Tabla 2. Asignación de fluorocromos a cada alelo y protocolo "touchdown" para cada uno de los SNPs del ensayo.

Nombre del gen	Localización del SNP	Alelo FAM	Alelo VIC	Protocolo "touchdown"
<i>ADAMTS9</i>	rs6795735	C	T	68-62°C
<i>COL8A</i>	rs13081855	G	T	61-55°C
<i>TGFBR1</i>	rs334353	G	T	61-55°C
<i>RAD51B</i>	rs8017304	A	G	61-55°C

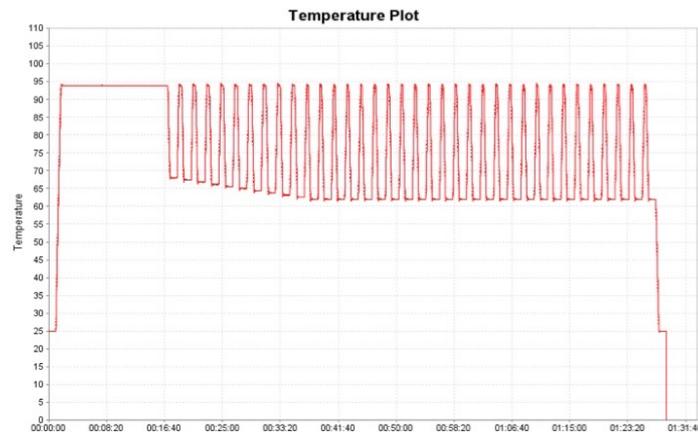


Figura 30. Gráfico de temperatura de termociclado en función del tiempo.

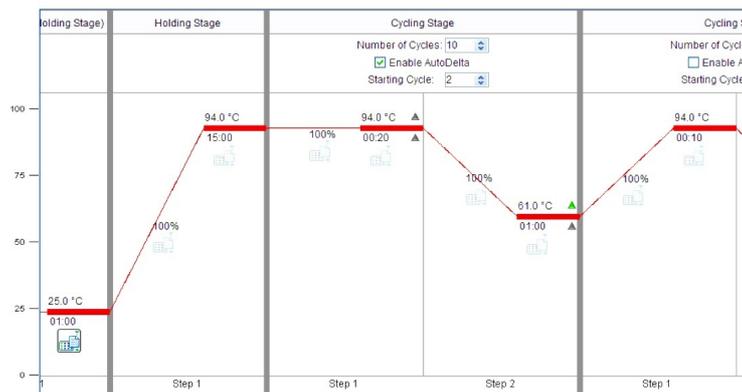


Figura 31. Esquema del programa de termociclado para el protocolo de 61 a 55°C en el que se observa la activación de la polimerasa a 94°C durante 15 minutos y la serie a temperatura de anillamiento/polimerización variable o protocolo "touchdown"

Una vez que las reacciones de KASP está completadas y la fluorescencia resultante ha sido medida, los datos en bruto deben ser interpretados para permitir que los genotipos sean asignados a las muestras de ADN correspondientes.

Esto se logra visualizando los valores de fluorescencia para cada muestra en un gráfico cartesiano. A menudo se hace referencia a estas parcelas como parcelas de agrupamiento (Fig. 32).

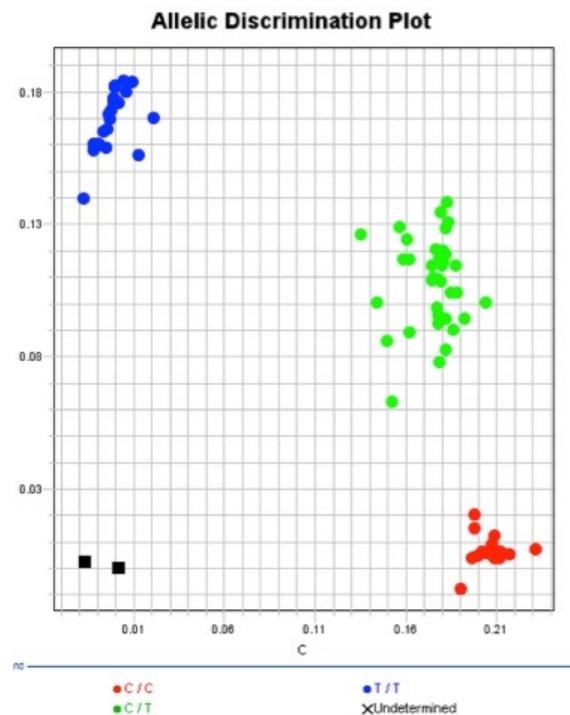


Figura 32. Distribución de genotipos en función de las fluorescencias asociadas a los alelos para el polimorfismo *ADAMTS9* donde se observa la población de homocigotos TT (azul), homocigotos CC (rojo), heterocigotos (verde). Los puntos negros representan los controles de agua.

El equipo de PCR a tiempo real es capaz de detectar las fluorescencias liberadas asociadas a cada alelo lo que nos permite obtener un gráfico en cuyos ejes figuran la intensidad de la fluorescencia para cada alelo (típicamente el eje X para trazar el valor de la fluorescencia FAM y el eje Y para trazar el valor de la fluorescencia HEX).

De este modo, la población genotipada se va agrupar en tres cúmulos o clústers: uno para los homocigotos para el alelo mayoritario; otra para los heterocigotos con los dos tipos fluorescencia y otra para los homocigotos del alelo minoritario.

5.6. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Para el análisis estadístico descriptivo de la muestra se emplearon los métodos descriptivos básicos. Para las variables cualitativas, se obtuvieron las frecuencias absoluta y relativa; y para las variables cuantitativas, los valores mínimo, máximo, media y desviación típica.

Para la comparación entre dos grupos se empleó el test de t-Student, U de Mann-Whitney o la Prueba Chi-cuadrado en función del tipo de variable y el cumplimiento de los supuestos paramétricos de normalidad y homogeneidad de varianzas comprobados con el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, respectivamente.

Para contrastar si el cambio entre las medidas de las variables en el tiempo (medidas temporales) fue significativo se realizó el modelo ANCOVA a través del procedimiento Modelo Lineal General (MLG), incluyendo como covariable el número de inyecciones. El modelo de regresión lineal múltiple se empleó para estudiar el efecto de las variables demográficas, clínicas y los polimorfismos sobre la ganancia de agudeza visual y el espesor de membrana tras el tratamiento.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 23.0 para Windows. Las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya $p < 0,05$.

La comprobación de si la distribución de genotipos cumple la Ley de Hardy-Weinberg se realizó con el test estadístico disponible en www.tufts.edu.

VI - RESULTADOS

VI - RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS RESULTADOS

6.1.1. Características de la población a estudio

En el estudio han participado 125 pacientes con las características basales que se describen en la Tabla 3:

Tabla 3. Descriptivo variables demográficas y clínicas.

Variable	Rango; Media (DT)	N	%
<i>Demográficas</i>			
Edad	45-94; 80,0 (8,9)		
Sexo			
Hombre		54	43,2
Mujer		71	56,8
<i>Clínicas</i>			
Antecedentes familiares			
No		101	80,8
Sí		24	19,2
Antecedentes oftalmológicos			
Cirugía catarata		35	28
Cirugía catarata, DMAE contralateral		27	21,6
DMAE avanzada contralateral		18	14,4
No		45	36

ECV			
No		97	77,6
Sí		27	21,6
HTA			
No		65	52
Sí		60	48
DM			
No		96	76,8
Sí		29	23,2
AV basal ojo afectado	0,002-1; 0,205 (0,206)		
Espesor macular (μ)	244-1068; 417,94 (119,24)		

DT: desviación típica; ECV: enfermedad cardiovascular; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; AV: agudeza visual.

6.1.2. Distribución por genotipos en los polimorfismos de los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304))

El estudio de los genotipos en los polimorfismos de los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304) se realizó en los 125 pacientes del ensayo y en los 125 pacientes de la población control. En los siguientes gráficos por sectores se representa la distribución por genotipos en la población estudiada para estos cuatro genes (casos, Fig. 33; y controles, Fig. 34):

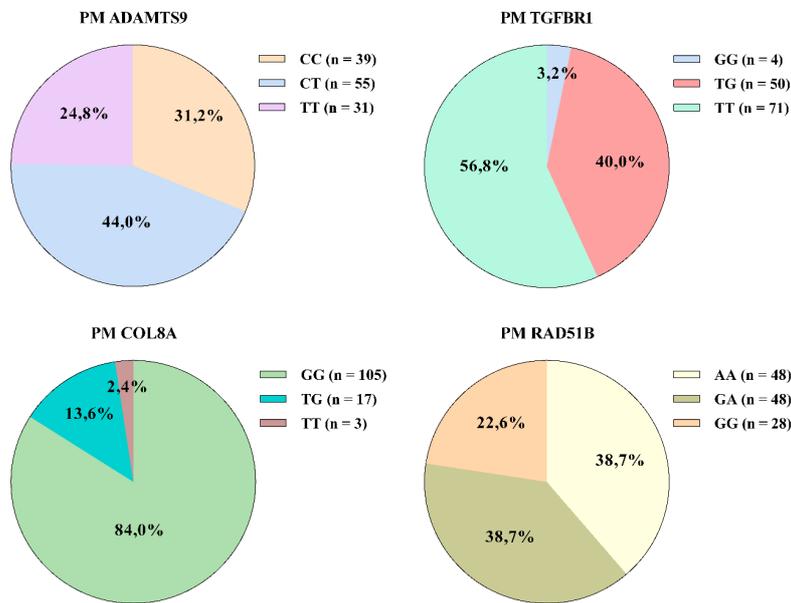


Figura 33. Gráfico de distribución por sectores de los genotipos en los polimorfismos de los casos a estudio.

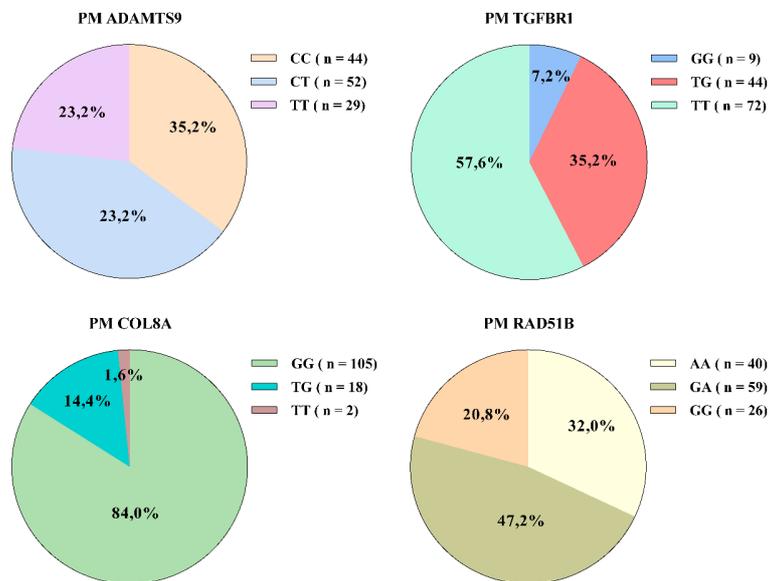


Figura 34. Gráfico de distribución por sectores de los genotipos en los polimorfismos en los controles a estudio.

Los polimorfismos en los controles cumplieron la Ley de Hardy-Weinberg: *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735) (p=0,6227), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) (p=0,25), *TGFBR1* (rs334353) (p=0,529) y *RAD51B* (rs8017304) (p=0,0814).

6.1.3. Estudio de susceptibilidad a enfermedad entre casos y controles

6.1.3.1. Influencia del polimorfismo *ADAMTS9* (rs6795735) en la susceptibilidad a DMAE.

Para valorar la existencia de diferencias entre los grupos de genotipos para el polimorfismo *ADAMTS9* entre casos y controles se realizaron tablas de contingencia para los cuatro modelos de análisis genético, no hallándose diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla de contingencia de casos frente a controles para *ADAMTS9*.

Modelos	Casos	Controles	χ^2 (g.l.)	p-valor
CODOMINANTE				
			$\chi^2(2) = 0,452$	0,798
CC	39 (31,2)	44 (35,2)		
CT	55 (44)	52 (41,6)		
TT	31 (24,8)	29 (23,2)		
DOMINANTE				
			$\chi^2(1) = 2,920$	0,087
CC	39 (31,2)	52 (41,6)		
CT+TT	86 (68,8)	73 (58,4)		
RECESIVO				
			$\chi^2(1) = 0,088$	0,767
CC+CT	94 (75,2)	96 (76,8)		
TT	31 (24,8)	29 (23,2)		
POR ALELOS				
			$\chi^2(1) = 0,706$	0,401
C	133 (53,2)	96 (55,6)		
T	117 (46,8)	81 (44,4)		

6.1.3.2. *Influencia del polimorfismo RAD51B (rs8017304) en la susceptibilidad a DMAE.*

Para valorar la existencia de diferencias entre los grupos de genotipos para el polimorfismo *RAD51B* entre casos y controles se realizaron tablas de contingencia para los cuatro modelos de análisis genético, no hallándose diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5).

Tabla 5. Tabla de contingencia de casos frente a controles para *RAD51B*.

Modelos	Casos	Controles	$\chi^2(\text{g.l.})$	p-valor
CODOMINANTE				
			$\chi^2(2) = 1,928$	0,381
AA	48 (38,7)	40 (32)		
GA	48 (38,7)	59 (47,2)		
GG	28 (22,6)	26 (20,8)		
DOMINANTE				
			$\chi^2(1) = 1,226$	0,268
AA	48 (38,7)	40 (32)		
GA+GG	76 (61,3)	85 (68)		
RECESIVO				
			$\chi^2(1) = 0,116$	0,733
GA+AA	96 (77,4)	99 (79,2)		
GG	28 (22,6)	26 (20,8)		
POR ALELOS				
			$\chi^2(1) = 0,779$	0,377
A	144 (58,1)	99 (53,8)		
G	104 (41,9)	85 (46,2)		

6.1.3.3. *Influencia del polimorfismo TGFBR1 (rs334353) en la susceptibilidad a DMAE.*

Para valorar la existencia de diferencias entre los grupos de genotipos para el polimorfismo *TGFBR1* entre casos y controles se realizaron tablas de contingencia para los modelos dominante y por alelos de análisis genético por ser los únicos que cumplen en este gen la homogeneidad entre los grupos, no hallándose diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla de contingencia de casos frente a controles para *TGFBR1*.

Modelos	Casos	Controles	$\chi^2(\text{g.l.})$	p-valor
DOMINANTE				
			$\chi^2(1) = 0,016$	0,898
GG+GT	54 (43,2)	53 (42,4)		
TT	71 (56,8)	72 (57,6)		
POR ALELOS				
			$\chi^2(1) = 3,449$	0,063
G	58 (23,2)	53 (31,4)		
T	192 (76,8)	116 (68,6)		

6.1.3.4. Influencia del polimorfismo *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) en la susceptibilidad a DMAE.

Para valorar si existen diferencias entre casos y controles en la distribución de genotipos para el rs13081855 del gen *COL8A1L/FILIP1L* se realizaron tablas de contingencia siguiendo el modelo por alelos de análisis genético por ser el único que se pudo aplicar al no existir homocigotos TT. En dicha comparación no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla de contingencia de casos frente a controles para *COL8A1L*.

Modelos	Casos	Controles	$\chi^2(\text{g.l.})$	p-valor
POR ALELOS				
			$\chi^2(1) = 2,138$	0,144
G	227 (90,8)	123 (86)		
T	23 (9,2)	20 (14)		

6.1.4. Determinación de la asociación de los antecedentes familiares y los polimorfismos de los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735), *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304)).

Para determinar la posible asociación entre los antecedentes familiares y las variantes genéticas de los polimorfismos se realizó la prueba Chi-cuadrado que mostró que no existe asociación significativa entre ambas variables, por tanto, la

distribución de genotipos no es diferente entre los pacientes que tienen antecedentes familiares de los que no los tienen.

A continuación, se muestran los estadísticos de contraste: *ADAMTS9* ($\chi^2(2) = 2,88$, $p = 0,237$), *TGFBR1* ($\chi^2(2) = 1,47$, $p = 0,480$), *COL8A11* ($\chi^2(2) = 1,94$, $p = 0,379$) y *RAD51B* ($\chi^2(2) = 1,66$, $p = 0,435$) (Fig. 35).

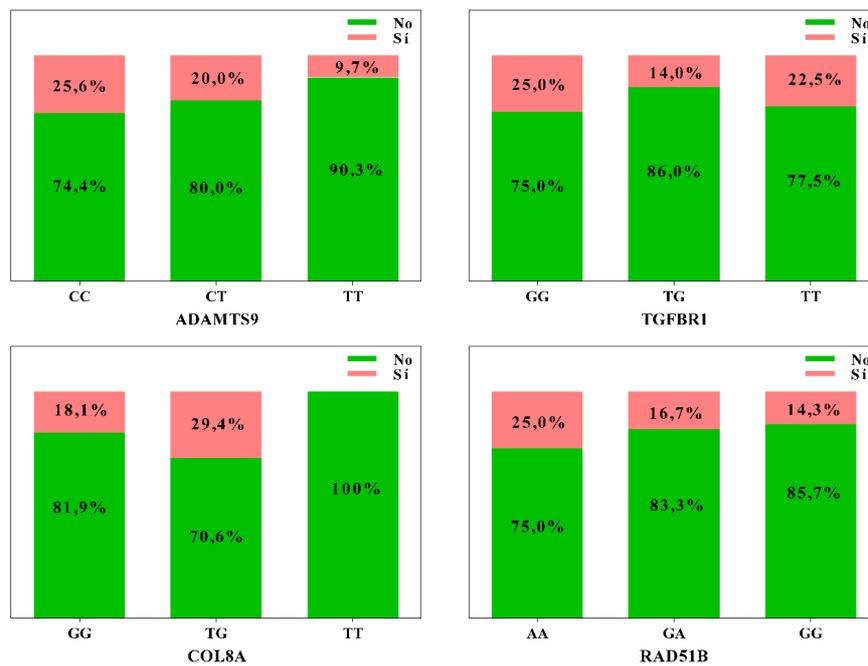


Figura 35. Porcentaje de pacientes con antecedentes familiares distribuidos por genotipos en los cuatro polimorfismos.

6.2. ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO DE LOS RESULTADOS

6.2.1. Influencia del polimorfismo *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735) en el tratamiento con ranibizumab intravítreo

En la ganancia de agudeza visual, reducción de espesor, número de inyecciones y en el porcentaje de respondedores no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el polimorfismo *ADAMTS9* en ninguno de los modelos considerados (tablas 8, 9, 10 y 11).

6.2.1.1. Análisis del polimorfismo ADAMTS9/ADAMTS9-AS2 (rs6795735) según modelo codominante.

Tabla 8. Análisis polimorfismo ADAMTS9 según modelo codominante

Variable	CC (n = 39)	CT (n = 55)	TT (n = 31)	ANOVA	
				F(2,122)	P-valor
Ganancia AV , Rango; Media (DT)	-0,4 - 0,5; 0,07 (0,17)	-0,6 - 0,9; 0,09 (0,22)	-0,5 - 0,4; 0,06 (0,19)	0,33	0,722
Reducción espesor , Rango; Media (DT)	-420 - 96; -63,18 (88,87)	-522 - 6; -77,11 (85,05)	-586 - 238; -65,84 (135,74)	0,25	0,778
				Kruskal-Wallis	
				$\chi^2(2)$	P-valor
Número inyecciones , Rango; Mediana (RI)	3 - 9; 5 (3 - 7)	3 - 10; 5 (3 - 7)	3 - 10; 4 (3 - 7)	0,53	0,768
				Prueba Chi ²	
				$\chi^2(2)$	P-valor
Respondedor , n(%)				3,67	0,159
No	22 (57,9)	22 (40)	17 (56,7)		
Sí	16 (42,1)	33 (60)	13 (43,3)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅).

6.2.1.2. Análisis del polimorfismo ADAMTS9/ADAMTS9-AS2 (rs6795735) según modelo dominante.

Tabla 9. Análisis polimorfismo ADAMTS9 según modelo dominante

Variable	CT (n = 55)	CC+TT (n = 70)	Prueba t-Student	
			t(123)	p-valor
Ganancia AV, Rango; Media (DT)	-0,6 - 0,85; 0,09 (0,22)	-0,5 - 0,5; 0,07 (0,18)	0,80	0,424
Reducción espesor, Rango; Media (DT)	-522 - 6; -77,11 (85,05)	-586 - 238; -64,36 (111,18)	-0,70	0,483
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones, Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 5 (3 - 7)	3 - 10; 5 (3 - 7)	1887,5	0,848
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor, n(%)			1,51	0,218
No	22 (40,0)	39 (57,4)		
Sí	33 (60,0)	29 (42,6)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅).

6.2.1.3. Análisis del polimorfismo ADAMTS9/ADAMTS9-AS2 (rs6795735) según modelo recesivo.

Tabla 10. Análisis polimorfismo ADAMTS9 según modelo recesivo

Variable	TT (n = 31)	CC+CT (n = 94)	Prueba t-Student	
			t(123)	p-valor
Ganancia AV, Rango; Media (DT)	-0,5 - 0,4; 0,06 (0,19)	-0,6 - 0,85; 0,08 (0,20)	-0,51	0,608
Reducción espesor, Rango; Media (DT)	-586 - 238; -65,84 (135,74)	-522 - 96; -71,33 (86,46)	0,26	0,793
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones, Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 4 (3 - 7)	3 - 10; 5 (3 - 7)	1337,5	0,483
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor, n(%)			0,79	0,373
No	17 (56,7)	44 (47,3)		
Sí	13 (43,3)	49 (52,7)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅).

6.2.1.4. Análisis del polimorfismo ADAMTS9/ADAMTS9-AS2 (rs6795735) según modelo por alelos

Tabla 11. Análisis del polimorfismo ADAMTS9 según modelo por alelos

Variable	C (n = 133)	T (n = 117)	Prueba t-Student	
			t(123)	p-valor
Ganancia AV , Rango; Media (DT)	-0,6 - 0,85; 0,08 (0,19)	-0,6 - 0,85; 0,08 (0,20)	0,07	0,947
Reducción espesor , Rango; Media (DT)	-522 - 96; -68,94 (86,91)	-586 - 238; -71,14 (113,71)	0,17	0,863
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones , Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 5 (3 - 7)	3 - 10; 5 (3 - 7)	7377,5	0,725
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor , n(%)			0,02	0,892
No	66 (50,4)	56 (48,7)		
Sí	65 (49,6)	59 (51,3)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅).

6.2.2. Influencia del polimorfismo *RAD51B* (rs8017304) en el tratamiento con ranibizumab intravítreo

En las Tablas 12, 13, 14 y 15 se muestran los análisis descriptivos y las comparaciones de las variables de estudio en el polimorfismo *RAD51B*.

El número de inyecciones mostró diferencias significativas en función de las variantes genéticas (Fig. 36), siendo el número de inyecciones en la variante GG significativamente inferior respecto a AA ($U = 468$, $z = -2,25$, $p = 0,024$) y GA ($U = 672,0$, $z = -2,59$, $p = 0,010$).

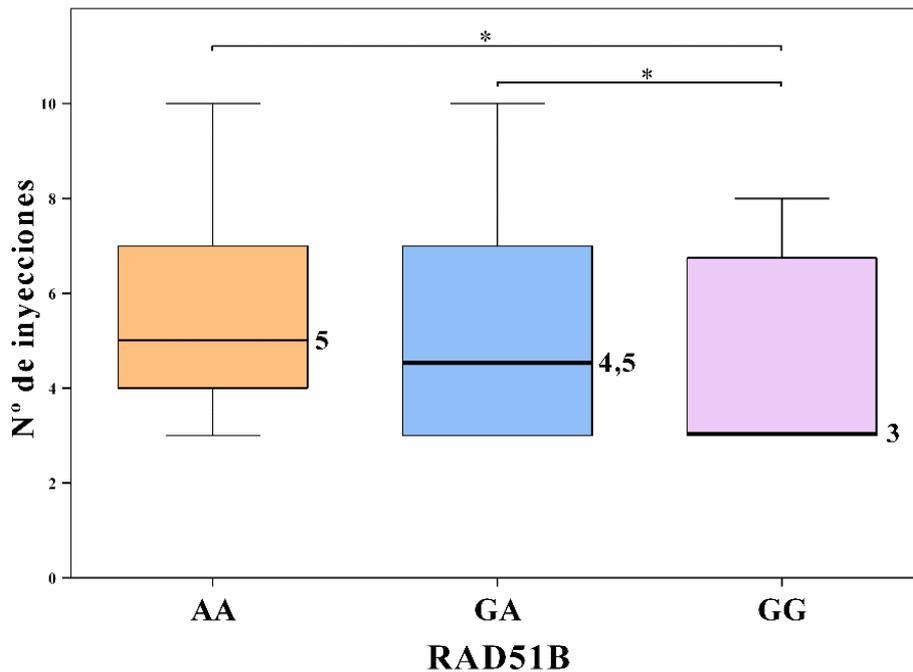


Figura 36. Número de inyecciones según las variantes genéticas polimorfismo *RAD51B*

6.2.2.1. Análisis del polimorfismo *RAD51B* (rs8017304) según modelo codominante

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variantes genéticas AA, GA y GG para el polimorfismo *RAD51B* ($U = 955,5$, $z = -1,47$, $p = 0,143$) en la ganancia de agudeza visual, en la reducción de espesor ni en el porcentaje de respondedores según el modelo codominante (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis polimorfismo *RAD51B* según modelo codominante

Variable	AA (n = 48)	GA (n = 48)	GG (n = 28)	ANOVA	
				F(2,122)	P-valor
Ganancia AV , Rango; Media (DT)	-0,6 - 0,6; 0,05 (0,20)	-0,5 - 0,9; 0,09 (0,20)	-0,4 - 0,5; 0,11 (0,17)	0,33	0,722
Reducción espesor , Rango; Media (DT)	-586 - 238; -70,13 (135,75)	-266 - 10; -70,06 (65,28)	-275 - 96; -67,61 (81,44)	0,25	0,778
				Kruskal-Wallis	
				$\chi^2(2)$	P-valor
Número inyecciones , Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 5 (4 - 7)	3 - 10; 4,5 (3 - 7)	3 - 8; 3 (3 - 7)	6,05	0,049*
				Prueba Chi ²	
				$\chi^2(2)$	P-valor
Respondedor , n(%)				1,08	0,581
No	25 (53,2)	24 (50)	11 (40,7)		
Sí	22 (46,8)	24 (50)	16 (59,3)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅). * p < 0,05

6.2.2.2. Análisis del polimorfismo *RAD51B* (*rs8017304*) según modelo dominante.

Según el modelo dominante (Tabla 13), el número de inyecciones en la variante AA de *RAD51B* es significativamente superior con respecto a la suma de las variantes GA y GG.

Tabla 13. Análisis polimorfismo *RAD51B* según modelo dominante

Variable	AA (n = 48)	GA+GG (n = 76)	Prueba t-Student	
			t(122)	p-valor
Ganancia AV, Rango; Media (DT)	-0,6 - 0,6; 0,05 (0,20)	-0,5 - 0,85; 0,10 (0,19)	-1,20	0,232
Reducción espesor, Rango; Media (DT)	-586 - 238; -71,22 (134,55)	-275 - 96; -69,16 (71,13)	-0,11	0,912
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones, Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 5 (4 - 7)	3 - 10; 4 (3 - 7)	1425,5	0,024*
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor, n(%)			0,66	0,417
No	26 (54,2)	35 (46,7)		
Sí	22 (45,8)	40 (53,3)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅). * p < 0,05

6.2.2.3. Análisis del polimorfismo *RAD51B* (rs8017304) según modelo recesivo

En el modelo recesivo el número de inyecciones en la suma de las variantes AA+GA de *RAD51B* resultó significativamente superior con respecto a GG (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis polimorfismo *RAD51B* según modelo recesivo

Variable	GG (n = 28)	GA+AA (n = 96)	Prueba t-Student	
			t(122)	p-valor
Ganancia AV , Rango; Media (DT)	-0,35 - 0,5; 0,11 (0,17)	-0,6 - 0,85; 0,07 (0,20)	0,86	0,391
Reducción espesor , Rango; Media (DT)	-275 - 96; -67,61 (81,44)	-586 - 238; -70,65 (105,54)	0,14	0,889
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones , Rango; Mediana (RI)	3 - 8; 3 (3 - 7)	3 - 10; 5 (3 - 7)	1042	0,043*
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor , n(%)			1,08	0,298
No	11 (40,7)	50 (52,1)		
Sí	16 (59,3)	46 (47,9)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅). * p < 0,05

6.2.3.4. Análisis del polimorfismo *RAD51B* (rs8017304) según modelo por alelos

En la Tabla 15 se muestran los resultados según el modelo por alelos en la que se observa que el número de inyecciones en el alelo A de *RAD51B* fue significativamente superior con respecto al alelo G.

Tabla 15. Análisis polimorfismo *RAD51B* según modelo por alelos

Variable	A (n = 144)	G (n = 104)	Prueba t-Student	
			t(246)	p-valor
Ganancia AV, Rango; Media (DT)	-0,6 - 0,85; 0,06 (0,20)	-0,5 - 0,85; 0,10 (0,18)	-1,43	0,154
Reducción espesor, Rango; Media (DT)	-586 - 238; -70,10 (116,25)	-275 - 96; -68,74 (73,64)	-0,11	0,916
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones, Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 5 (3 - 7)	3 - 10; 4 (3 - 7)	6083	0,010*
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor, n(%)			1,16	0,280
No	74 (52,1)	46 (45,1)		
Sí	68 (47,9)	56 (54,9)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅). * p < 0,05

En el análisis estadístico realizado según los cuatro modelos de análisis por genes se observa que la presencia del alelo A en pacientes con neovascularización coroidea se relaciona con un mayor número de inyecciones de ranibizumab intravítreo para el tratamiento de esta enfermedad.

6.2.3. Influencia del polimorfismo TGFBR1 (rs334353) en el tratamiento con ranibizumab intravítreo

Con respecto al polimorfismo *TGFBR1* sólo se pudieron realizar los análisis estadísticos por genotipos según el modelo dominante y por alelos ya que fueron los dos grupos que cumplieron criterios de homogeneidad con respecto al número de pacientes para poder realizar la comparación posterior (GG (n=4), TG (n=50), TT (n=71)).

6.2.3.1. Análisis del polimorfismo TGFBR1 (rs334353) según modelo dominante

En el polimorfismo *TGFBR1* y según el modelo dominante (Tabla 16), la ganancia de agudeza visual en la variante TT fue significativamente inferior con respecto a GG+TG.

Tabla 16. Análisis polimorfismo *TGFBR1* según modelo dominante

Variable	TT (n = 71)	GG+TG (n = 54)	Prueba t-Student	
			t(123)	p-valor
Ganancia AV, Rango; Media (DT)	-0,6 - 0,5; 0,05 (0,20)	-0,1 - 0,85; 0,12 (0,18)	-1,99	0,048*
Reducción espesor, Rango; Media (DT)	-586 - 96; -73,25 (99,64)	-522 - 238; -65,65 (102,04)	-0,42	0,676
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones, Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 5 (3 - 7)	3 - 10; 5 (3 - 7)	1866	0,793
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor, n(%)			0,07	0,794
No	34 (48,6)	27 (50,9)		
Sí	36 (51,4)	26 (49,1)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅). * p < 0,05

6.2.3.2. Análisis del polimorfismo *TGFBR1* (rs334353) según modelo por alelos

En el análisis estadístico según el modelo por alelos en el polimorfismo *TGFBR1* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis polimorfismo *TGFBR1* según modelo por alelos

Variable	G (n = 58)	T (n = 192)	Prueba t-Student	
			t(248)	p-valor
Ganancia AV, Rango; Media (DT)	-0,1 - 0,85; 0,11 (0,18)	-0,6 - 0,85; 0,07 (0,20)	1,32	0,189
Reducción espesor, Rango; Media (DT)	-522 - 238; -57,74 (106,73)	-586 - 124; -73,66 (98,06)	1,06	0,290
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones, Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 5 (3 - 7)	3 - 10; 5 (3 - 7)	5307	0,579
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor, n(%)			0,27	0,601
No	30 (52,6)	92 (48,7)		
Sí	27 (47,4)	97 (51,3)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅).

6.2.4. Influencia del polimorfismo *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) en el tratamiento con ranibizumab intravítreo

Con respecto al polimorfismo *COL8A1L/FILIP1L* sólo se pudo realizar el análisis estadístico por genotipos según el modelo por alelos ya que fueron los dos grupos que cumplieron criterios de homogeneidad con respecto al número de pacientes para poder realizar la comparación posterior (G (n=227) vs T (n=23)).

6.2.4.1. Análisis del polimorfismo *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) según modelo por alelos

La reducción de espesor macular en pacientes portadores de alelo G en el polimorfismo *COL8A1L/FILIP1L* fue significativamente superior con respecto a los pacientes portadores de alelo T (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis polimorfismo *COL8A1L/FILIP1L* según modelo por alelos

Variable	G (n = 227)	T (n = 23)	Prueba t-Student	
			t(248)	p-valor
Ganancia AV, Rango; Media (DT)	-0,6 - 0,85; 0,08 (0,19)	-0,6 - 0,4; 0,05 (0,19)	0,67	0,506
Reducción espesor, Rango; Media (DT)	-586 - 238; -74,56 (103,06)	-127 - 77; -24,61 (45,06)	-2,30	0,022*
			U de Mann-Whitney	
			U	p-valor
Número inyecciones, Rango; Mediana (RI)	3 - 10; 5 (3 - 7)	3 - 10; 5 (4 - 7)	2342,5	0,406
			Prueba Chi-cuadrado	
			$\chi^2(1)$	p-valor
Respondedor, n(%)			1,90	0,167
No	108 (48,2)	14 (63,6)		
Sí	116 (51,8)	8 (36,4)		

DT: desviación típica. RI: rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅). * p < 0,05

6.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS RESULTADOS

6.3.1. Tasa de respuesta a tratamiento a ranibizumab intravítreo en nuestra población

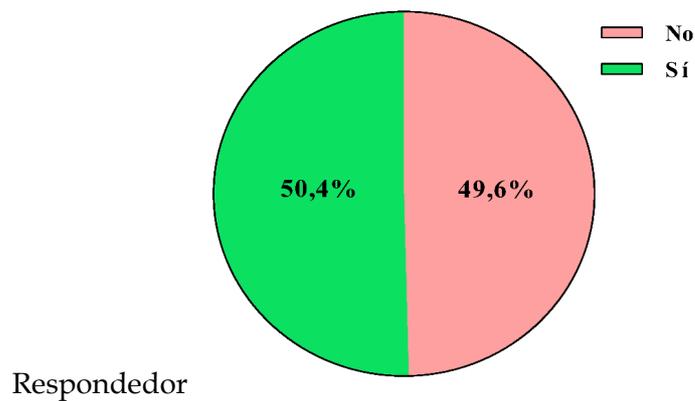


Figura 37. Tasa de respuesta a tratamiento

6.3.2. Número de inyecciones intravítreas en nuestra población

El número de inyecciones osciló entre 3 y 10 cuya mediana fue de 5 inyecciones (rango intercuartílico: 3-7) (Fig. 38).

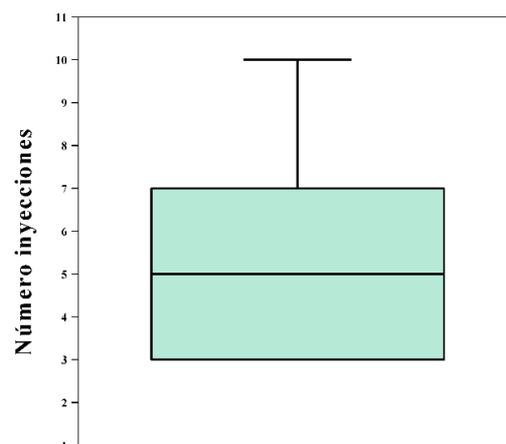


Figura 38. Número de inyecciones

6.3.3. Factores influyentes en la ganancia de agudeza visual.

Para estudiar el efecto de las variables demográficas, clínicas y los polimorfismos sobre la ganancia de AV tras el tratamiento, se realizó un modelo de regresión lineal múltiple cuyo resultado se muestra en la Tabla 19. El modelo analizado resultó significativo ($F(17,105) = 1,79$, $p = 0,040$) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,215, por lo que el 21,5% de la variabilidad de la ganancia en AV queda explicada por las variables introducidas en el modelo.

En relación con el efecto predictivo de cada una de las variables independientes, se observa que las variables significativas son los antecedentes familiares y el antecedente oftalmológico de cirugía previa de catarata. El hecho de tener antecedentes familiares tiene un efecto significativo e indirecto en la ganancia de AV ($\beta = -0,099$, $p = 0,039$) de forma que tener antecedentes familiares hace disminuir la ganancia de AV en 0,099 unidades, en promedio, con respecto a los pacientes sin antecedentes familiares.

Por otra parte, el hecho de tener cirugía previa de catarata como antecedente tiene un efecto significativo e indirecto en la ganancia de AV ($\beta = -0,126$, $p = 0,001$) de forma que tener dicho antecedente hace disminuir la ganancia de AV en 0,126 unidades, en promedio, con respecto a los pacientes sin antecedentes oftalmológicos.

El resto de variables no presentan efectos significativos sobre la ganancia de AV.

Tabla 19. Efecto de las variables demográficas, clínicas y polimorfismos para la predicción de la ganancia de AV.

Variable	β (ET)	Beta	IC _{95%} β	T	p-valor
Edad	-0,004 (0,00)	-0,19	-0,01 - 0,01	-1,752	0,083
Sexo (Mujer vs. Hombre)	-0,013 (0,04)	-0,03	-0,08 - 0,06	-0,376	0,708
A. FAM (Sí vs. No)	-0,099 (0,05)	-0,20	-0,19 - -0,01	-2,088	0,039*
ECV (Sí vs. No)	-0,011 (0,05)	-0,02	-0,10 - 0,08	-0,226	0,822
HTA (Sí vs. No)	-0,009 (0,04)	-0,02	-0,09 - 0,07	-0,223	0,824
DM (Sí vs. No)	0,071 (0,04)	0,16	-0,02 - 0,16	1,619	0,108
A. OFT					
Cirugía catarata	-0,126 (0,05)	-0,29	-0,22 - -0,03	-2,614	0,010*
Cirugía catarata, DMAE	-0,039 (0,05)	-0,08	-0,14 - 0,07	-0,738	0,462
DMAE contralateral	-0,072 (0,06)	-0,13	-0,19 - 0,04	-1,263	0,209
No	Ref.				
ADAMTS9					
CC	0,001 (0,05)	0,01	-0,10 - 0,10	0,003	0,997
CT	0,041 (0,05)	0,11	-0,05 - 0,13	0,891	0,375
TT	Ref.				
TGFBR1					
TG	0,152 (0,10)	0,39	-0,05 - 0,36	1,492	0,139
TT	0,047 (0,10)	0,12	-0,16 - 0,25	0,462	0,645
GG	Ref.				
COL8A1L					

GG	0,077 (0,12)	0,15	-0,16 - 0,31	0,658	0,512
TG	0,033 (0,13)	0,06	-0,21 - 0,28	0,264	0,793
TT	Ref.				
RAD51B					
AA	-0,08 (0,05)	-0,20	-0,18 - 0,02	-1,644	0,103
GA	-0,052 (0,05)	-0,13	-0,15 - 0,04	-1,093	0,277
GG	Ref.				
Constante	0,356 (0,244)		0,01 - 0,02	1,459	0,148

ET: error típico. IC: intervalo confianza. Ref: valor de referencia.

6.3.4. Valoración del efecto del tratamiento en las variables de respuesta: agudeza visual y espesor membrana

Para el control de forma estadística del influjo que el número de inyecciones puede ejercer en el cambio de una medida para la siguiente (factor tiempo: medidas temporales pre, a los 3, 6 y 12 meses) se empleó el análisis de covarianza, ANCOVA, donde el número de inyecciones actuó como covariable. Si la covariable utilizada no presenta efecto significativo, cabe esperar que los resultados del ANCOVA sean similares a los del ANOVA, indicando esto que no es necesario ejercer control sobre la covariable incluida en el análisis y, por tanto, se procederá a realizar el ANOVA con medidas repetidas en un factor a través del procedimiento MLG.

En referencia a la comprobación del supuesto de esfericidad se aplicó la prueba de Mauchly (Tabla 20) y se obtiene que dicha hipótesis no es asumible en las variables. Para comprobar el grado de desviación de la esfericidad se obtuvo el estimador de ϵ de Greenhouse-Geisser, considerándose que se cumple el supuesto de esfericidad cuando ϵ toma un valor mayor que 0,75. En este caso se obtienen valores mayores a 0,75 por lo que el ANOVA puede considerarse robusto aplicando la corrección de Greenhouse-Geisser para la estimación de F.

Tabla 20. Prueba esfericidad de Mauchly.

Variable	W de Mauchly	Aprox. $\chi^2(5)$	p-valor	Estimación de épsilon
				Greenhouse-Geisser
Agudeza visual	0,658	19,28	0,002	0,779
Espesor membrana	0,829	21,38	0,001	0,813

En la Tabla 21 se muestra el resultado del análisis para los factores intra-sujetos:

Tabla 21. Medias (DT) y contrastes estadísticos en las variables.

Variable	Medida, media (DT)				Pruebas de efectos dentro de sujetos† F(g.l.); p-valor (eta ²)	
	Pre	3 meses	6 meses	12 meses	Tiempo	Tiempo*N° inyecciones
Agudeza visual‡	0,21 (0,21)	0,27 (0,22)	0,27 (0,23)	0,28 (0,24)	F(1,42;174,17) = 17,43; p < 0,001*** (0,124)	F(1,42;174,17) = 8,04; p = 0,002** (0,061)
Espesor membrana	417,94 (119,24)	352,34 (70,01)	347,97 (71,95)	339,95 (70,39)	F(1,35;165,92) = 15,82; p < 0,001*** (0,114)	F(1,35;165,92) = 1,85; p = 0,173 (0,015)

g.l.: grados de libertad. Eta²: eta cuadrado parcial (tamaño del efecto). †Estimación de Greenhouse-Geisser.

‡Medias estimadas para: Número inyecciones = 5,19. **p < 0,01 ***p < 0,001.

De estos resultados se puede extraer que:

- En la agudeza visual la interacción entre el factor tiempo y la covariable (número de inyecciones) fue significativa por lo que hay una relación significativa entre el número de inyecciones y la diferencia temporal en agudeza visual. En la figura 39 se muestra la evolución de la agudeza visual corregida por el número de inyecciones en la que se observa que hay un aumento significativo entre el pre tratamiento y el resto de medidas. A partir de los 3 meses el aumento entre las medidas no resultó significativo.

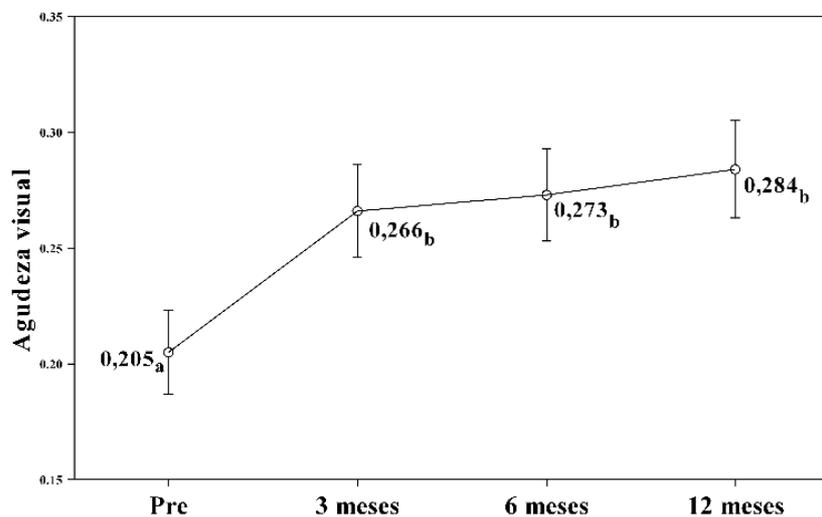


Figura 39. Evolución de la agudeza visual en la población del estudio (media \pm error típico).

- En el espesor de membrana la interacción entre el factor tiempo y la covariable (número de inyecciones) no fue significativa por lo que no existe una relación significativa entre el número de inyecciones y la diferencia temporal en agudeza visual. En la figura 40 se muestra la evolución del espesor de membrana en la que se observa que hay una disminución significativa entre el pre tratamiento y el resto de medidas. A partir de los 3 meses la disminución entre las medidas no resultó significativa hasta los 12 meses, en los que el espesor fue significativamente inferior con respecto a los 3 y 6 meses.

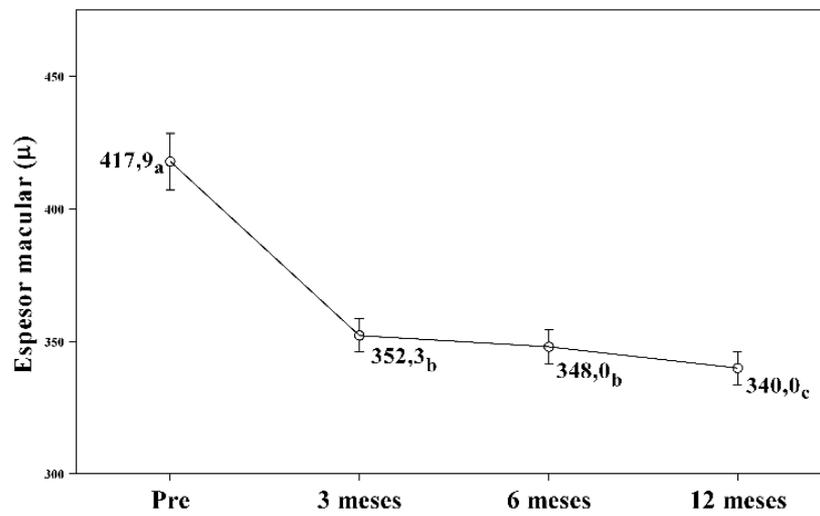


Figura 40. Evolución del espesor macular en la población del estudio (media \pm error típico).

VII - DISCUSIÓN

VII - DISCUSIÓN

Los estudios de asociación de genoma completo para DMAE han estimado que los *loci* identificados en la actualidad pueden justificar aproximadamente el 60-70% de la predisposición heredada a las formas clínicamente significativas de esta enfermedad (193). La ausencia de asociación con otros polimorfismos genéticos no indica que no haya más genes implicados en la enfermedad, sino que simplemente el polimorfismo funcional en el gen no ha sido identificado o no existe con la suficiente frecuencia en la población de estudio como para ser detectado en estos estudios estadísticos a gran escala (231).

Los primeros estudios de asociación genética vincularon al gen de *CFH* con la susceptibilidad a padecer DMAE. Posteriormente, se han publicado estudios con resultados contradictorios, aunque a día de hoy los polimorfismos de los genes *CFH* y *HTRA1/ARMS2* han mostrado una clara asociación con la tendencia a padecer la enfermedad (232).

En nuestro trabajo hemos realizado un estudio de susceptibilidad a DMAE en una población de donantes de sangre de nuestra área de salud. Comparando la distribución de genotipos de esta población con la de los pacientes con DMAE no se encontraron diferencias significativas, lo que apoya que el efecto de estos polimorfismos, sobre todo *RAD51B*, *TGFBR1* y *COL8A1*, influye en la farmacogenética pero no parece ser relevante en cuanto a la susceptibilidad al desarrollo de la DMAE.

El tratamiento con fármacos antiangiogénicos, como ranibizumab, es a día de hoy, el único tratamiento para la neovascularización coroidea existente en las formas avanzadas de DMAE.

El primer estudio farmacogenético fue publicado en 2007 en una cohorte de 88 pacientes sometidos a terapia fotodinámica por NVC, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (233).

El descubrimiento de polimorfismos en genes asociados a susceptibilidad de DMAE abre una puerta a la investigación entre las potenciales relaciones entre estas variaciones y la respuesta al tratamiento antiangiogénico en las formas húmedas de esta patología. Estas relaciones se han estudiado sobre todo en los polimorfismos de riesgo de los genes del factor H y del factor 3 del complemento, los genes *ARMS2/HTRA1*, los genes codificantes de VEGF-A y su receptor (213, 216, 224).

Numerosos estudios han demostrado la asociación entre las variantes genéticas en el gen *CFH* y la respuesta al tratamiento antiangiogénico con bevacizumab (206, 207) o con ranibizumab (149, 209, 210, 236). Por el contrario, para Orlin y colaboradores (215) no existen diferencias entre los genotipos y la respuesta al tratamiento antiangiogénico (bevacizumab o ranibizumab) en pacientes con DMAE. Por otro lado, se ha asociado una mejor respuesta a tratamiento en variantes genéticas del factor C3 del complemento (162), *ARMS2/HTRA1* (216), *VEGF-A* (212-214, 224) y *ApoE* (220, 221).

En nuestro estudio hemos hallado resultados que demuestran una relación entre los polimorfismos genéticos y la respuesta a tratamiento antiangiogénico con ranibizumab.

La proteína ADAMTS9 ha demostrado su papel antiangiogénico en el cáncer esofágico y nasofaríngeo disminuyendo los niveles de expresión de MMP9 y VEGF-A (194) pudiendo de esta forma estar implicada en la enfermedad inflamatoria ocular. El gen que codifica a ADAMTS 9 se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 en la región 14.1 (3p14.1). Una variante genética podría influir en la respuesta al tratamiento de la DMAE aunque no se han encontrado asociaciones estadísticamente significativas entre los genotipos de este polimorfismo y la respuesta al tratamiento antiangiogénico (198). Shah y colaboradores investigaron diez polimorfismos en diez genes de susceptibilidad a la DMAE por su posible

asociación con la respuesta a tratamiento antiangiogénico no encontrando relación farmacogenética para el polimorfismo rs6795735 en el gen *ADAMTS9* (235), que también hemos estudiado en nuestro trabajo. En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en los genotipos del polimorfismo *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735) con respecto a la respuesta al tratamiento, ni en la ganancia de AV, ni en la reducción del espesor macular para los distintos genotipos en ninguno de los cuatro modelos estudiados aplicados a este polimorfismo (dominante, codominante, recesivo o por alelos), ni en el número de inyecciones. Aunque Helisami y colaboradores encontraron asociación entre el alelo de riesgo T de rs 6795735 y susceptibilidad a padecer DMAE (199), a día de hoy en los estudios llevados a cabo no han encontrado relación entre las variantes genéticas de *ADAMTS9* y la respuesta a tratamiento con ranibizumab en la NVC. La variante genética estudiada no parece influir en la susceptibilidad a padecer DMAE y/o en la respuesta al tratamiento, lo cual no significa que no exista otra variante genética asociada a esta proteína que cumpla esta condición.

Los polimorfismos en el gen *RAD51B* (rs8017304 (A>G), rs17105278 (T>C) y rs4092566 (C>T)) han sido señalados como posibles biomarcadores de riesgo de padecer DMAE (187, 236). El gen que codifica a RAD51 se localiza en el brazo largo del cromosoma 15 en la región 15.1 (15q15.1). Esta proteína está implicada tanto en el proceso de reparación del ADN celular, como en el provocado por el estrés oxidativo, de modo que una alteración genética en su síntesis podría significar alteraciones a este nivel celular (205). En la actualidad, no existen estudios que demuestren diferencias entre los genotipos en este polimorfismo de *RAD51B* y la respuesta al tratamiento en las formas húmedas de la DMAE. Shah y colaboradores también incluyeron a *RAD51B* (rs 8017304) como un posible gen asociado a las respuesta al tratamiento antiangiogénico en la DMAE, pero no encontraron diferencias entre los distintos genotipos y la respuesta al tratamiento (235).

En el análisis genético realizado en este trabajo para los diferentes genotipos en el polimorfismo rs8017304 de *RAD51B*, sí se han encontrado diferencias significativas en el número de inyecciones necesarias en el tratamiento de la NVC. Así, en los portadores del genotipo GG el número de inyecciones administradas resultó ser significativamente inferior respecto a los genotipos AA ($U = 468$, $z = -$

2,25, $p = 0,024$) y GA ($U = 672,0$, $z = - 2,59$, $p = 0,010$). La presencia del alelo A en pacientes con NVC en nuestra serie implica un mayor número de inyecciones de ranibizumab intravítreo en el tratamiento de la DMAE, tal y como se demuestra en el análisis estadístico realizado según los cuatro modelos de análisis (dominante, recesivo y por alelos). Para los pacientes con el alelo A son precisas cinco inyecciones de media de tratamiento, mientras que para los pacientes portadores del alelo G son necesarias cuatro inyecciones de media. Las variantes alélicas en este polimorfismo no han demostrado asociación con otros parámetros de respuesta como la AV o la reducción del espesor de la membrana al final del tratamiento antiangiogénico.

La diferencia en el número de inyecciones intravítreas que precisan los pacientes para frenar la actividad de la NVC asociada a estadios avanzados de DMAE se puede considerar un marcador indirecto de respuesta al tratamiento, ya que cuantas más inyecciones precise el paciente, más tiempo va a tardar en su curación y se considera peor respuesta al tratamiento. Estos resultados, en cuanto al número de inyecciones, pueden ser motivo de debate, ya que no existe un consenso en el número de retratamientos (216). Existe una diferencia en el número de inyecciones que necesitan los pacientes en el tratamiento de la DMAE, de modo que hay pacientes que precisan 3-4 inyecciones para tener una buena respuesta a tratamiento mientras que otros pacientes precisan hasta 12 inyecciones. El origen de esta heterogeneidad en la respuesta al tratamiento es desconocido, y por eso se cree que la genética puede tener jugar un papel en ella. En este sentido, el número de inyecciones en nuestro estudio varía de 3 a 10 inyecciones, con una mediana de 5 inyecciones.

Diversos estudios publicados han utilizado el número de inyecciones como índice de respuesta; algunos (208, 209, 220, 228) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en este parámetro en el tratamiento de la NVC y determinados polimorfismos de *ApoE*. Hagstrom y colaboradores en el año 2013 realizaron un estudio en una cohorte de 834 pacientes pertenecientes al estudio CATT donde encontraron que los pacientes que presentaban el genotipo AA del SNP rs11200638 de *HTRA1* precisaron mayor número de inyecciones frente a los homocigotos GG y los heterocigotos del gen, aunque no fueron diferencias

estadísticamente significativas (162). Lee y colaboradores (159) demostraron que los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo 402H requirieron más inyecciones de ranibizumab a pesar de que la AV postratamiento no estaba influenciada por el genotipo. En su estudio, los pacientes que presentaron el alelo de riesgo de *CFH* recibieron como media una inyección más que la media. En nuestro estudio existe asociación entre el número de inyecciones necesarias para el tratamiento de cada paciente y el polimorfismo rs 8017304 de *RAD51*, sin influir en la AV al final del tratamiento. Dos Reis Veloso en 2014 (237) también encuentran diferencias en la media de inyecciones intravítreas en el tratamiento de pacientes con el alelo de riesgo C del gen de *VEGF*, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, como tampoco lo fueron en el estudio de Mc Kibbin y colaboradores (238).

La controversia entre los diferentes estudios acerca de si existe asociación entre el número de inyecciones necesarias en el tratamiento de la NVC y los polimorfismos genéticos puede deberse a la no uniformidad en el criterio de las pautas de mantenimiento tras las dosis de carga de 3 inyecciones mensuales. Los resultados en el análisis de este parámetro no son, en gran medida, comparables porque mientras que en unos estudios se realiza pauta PRN de mantenimiento (pinchando según si hay reactivación de la NVC o no), en otros se establece la pauta de inyecciones mensuales durante el primer año. Es posible que, en pautas de tratamiento mensuales, los pacientes malos respondedores tengan buenas medidas de AV postratamiento, incluso similares a pacientes buenos respondedores a tratamiento. Por este motivo, estos estudios de asociación genética resultan útiles para tratar de identificar a aquellos pacientes en los que la pauta PRN puede ser escasa y deben ser tratados con un régimen de inyecciones mensuales o para identificar pacientes que pueden ser buenos respondedores y que se pueden beneficiar de intervalos más largos de seguimiento, evitando visitas y tratamientos innecesarios.

La ganancia de AV es el mejor parámetro de evaluación subjetiva de respuesta al tratamiento por parte del paciente, ya que un incremento de visión de una línea hace que se note la mejoría y que la adhesión al tratamiento sea mayor. Por tanto, se consideran pacientes respondedores al tratamiento aquellos que

presentaron ganancia de AV de al menos una línea en el test de Snellen y con reducción de espesor macular de al menos 100 μm medida con OCT. Por el contrario, los no respondedores serán aquellos que no han presentado mejoría en su agudeza visual y persiste exudación macular, o no ha habido reducción significativa de la exudación.

Abedi y colaboradores (239) encontraron una ganancia de más de siete letras en la escala EDTRS para los pacientes que presentaban el alelo T en el SNP de VEFGA rs3025000 a los seis meses de inicio del tratamiento con ranibizumab o bevacizumab. Estos autores proponen los seis meses como la fecha crítica en la que se puede predecir la respuesta del paciente, sin tener que esperar a los 12 ó 24 meses, ya que los pacientes han recibido su dosis de carga de 3 inyecciones y un número reducido de inyecciones en fase de mantenimiento. Así, no hay sesgo por haber recibido un mayor número de inyecciones en un tratamiento más prolongado en el tiempo.

En la figura 35 se muestra la evolución de la AV, corregida por el número de inyecciones. En ella se observa un aumento significativo de la AV entre el pretratamiento y las medidas posteriores. Sin embargo, a partir de los 3 meses el aumento de AV no resultó significativo. Así mismo, en la figura 36, donde se muestra la evolución del espesor macular, se observa una disminución significativa entre el pretratamiento y el resto de medidas. A partir de los 3 meses, la disminución entre las medidas del espesor macular no resultó significativa hasta los 12 meses, en los que el espesor fue significativamente inferior con respecto a los 3 y 6 meses. Por tanto, con estos dos hechos corroboramos que los seis meses son la fecha clave para evaluar la respuesta al tratamiento.

El gen que codifica a TGFBR1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 9 en la posición 22.33 (9q22.33) y se ha demostrado la expresión de la proteína TGFB en las células retinianas en modelos experimentales pudiendo observarse su activación en la angiogénesis cuando existe daño a nivel del EPR. Aunque se postula que la inactivación del receptor TGFBR1 puede constituir una diana posible para el tratamiento de la DMAE (208), serían necesarios estudios experimentales sólidos que demostrasen esta hipótesis.

En el análisis genético según el modelo dominante para el polimorfismo *TGFBR1* (rs334353) (Tabla 16), la ganancia de agudeza visual asociada al genotipo TT fue significativamente inferior con respecto a GG+TG. Estas diferencias no fueron significativas al realizar la comparación por alelos en este gen. Las diferencias encontradas en nuestro ensayo en la variante TT apoyaría la teoría de que las alteraciones en *TGFBR1* podrían estar relacionadas con la diferente respuesta al tratamiento antiangiogénico en pacientes con DMAE.

Nuestros resultados, en cuanto a la relación entre los distintos genotipos del polimorfismo *TGFBR1* y la ganancia de AV, van en la misma línea de los resultados de estudios farmacogenéticos de otros autores. Dos Reis Veloso y colaboradores demostraron al estudiar los genotipos del polimorfismo de *VEGF* en un modelo recesivo (CC vs CT+TT), que sí existían diferencias estadísticamente significativas. Encontraron que el genotipo CC conlleva a una peor respuesta al tratamiento a ranibizumab en cuanto a una peor AV postratamiento y una menor reducción de espesor macular (237). Cruz-González y colaboradores realizaron un estudio para valorar la respuesta a ranibizumab intravítreo en relación con los genotipos de *VEGF-A*, observando diferencias estadísticamente significativas para los genotipos CC de rs833061 y AA del rs699947, lo que ocasionaba una mejor AV tras el tratamiento (217). Por otro lado, Hermann y colaboradores también mostraron una ganancia de entre 1 y 3 líneas en la escala de Snellen en pacientes con alelos minoritarios en los polimorfismos rs4576072 y rs6828477 del gen *VEGFR2* tras un año de tratamiento con ranibizumab intravítreo (225). Dikmetas y colaboradores hallaron una mayor ganancia de AV en los pacientes que presentaban el genotipo TT del polimorfismo Y402H en el gen *CFH* sobre los que presentaban el genotipo CC (240). McKibbin y colaboradores mostraron diferencias en la ganancia de AV en pacientes tratados con bevacizumab intravítreo con una mayor ganancia de AV para los el genotipo CC de Y402H en el gen *CFH* (238).

En el estudio SUSTAIN, la media de ganancia de AV fue de 5,8 letras en la escala EDTRS tras la dosis de carga y de 3,6 letras de ganancia al mes 12. La reducción del espesor macular media fue de -101,1 μm tras la dosis de carga a los 3 meses y de -91,5 μm al mes 12. La media de inyecciones tras la dosis de carga fue de 2,7 (111).

Nuestros resultados confirman que la AV postratamiento está asociada significativamente con los genotipos de *TGFBR1* de los sujetos de nuestro estudio. Para Orlin y colaboradores (215) la AV al final de tratamiento no está influenciada por los polimorfismos genéticos, en su caso con rs 1061170, rs 10490924, rs3750848, rs3793917, rs11100638 y rs932275 de *CFH*, *ARMS2* y *HTRA1*.

El gen *COL8A1* se localiza en el cromosoma 3q12.1 y codifica la transcripción del colágeno tipo VIII, principal componente de la membrana de Bruch (201). El colágeno tipo VIII participa en la proliferación vascular (202) y en la angiogénesis, ya que se ha detectado en las fases de proliferación de los hemangiomas (203).

El papel de los polimorfismos en el gen *COL8A1* y la patogenia de la DMAE no está del todo establecida, aunque tras los estudios de asociación de genoma de Seddon y colaboradores se señaló como un posible biomarcador de susceptibilidad de enfermedad (187, 236). Velázquez-Villoria y colaboradores encontraron una asociación positiva entre la NVC asociada a alta miopía y los polimorfismos rs13095226 y rs669676 en este gen (241). Por el contrario, Yu y colaboradores no encontraron asociación entre el polimorfismo rs13095226 de este gen y la DMAE en una población china (242).

Observando los resultados obtenidos en la variación del espesor macular, hay que destacar la reducción de espesor macular en pacientes portadores de alelo G en el polimorfismo *COL8A1L/FILIP1L*, que fue significativamente superior con respecto a los pacientes portadores de alelo T (Tabla 18). En estudios farmacogenéticos realizados para polimorfismos en el gen de *CFH*, Teper y colaboradores (209) al igual que Shah y colaboradores (235) encuentran mejoría en la respuesta a tratamiento con disminución en el espesor macular sin asociar ganancia de AV en su caso.

Nuestros resultados destacan el papel de los polimorfismos en este gen, concretamente en el rs13081855, pues su alelo T se asocia con peor respuesta al tratamiento con ranibizumab ya que los pacientes portadores presentan menor reducción en el espesor macular. Es posible que una alteración en un gen codificante de una proteína componente de la matriz extracelular, *COL8A1*, esté

implicado en una peor reparación celular tras un daño como el edema macular, aunque serían necesarios estudios que corroborasen esta teoría.

A pesar de que en nuestro estudio encontramos diferencias en cuanto a la respuesta a tratamiento con ranibizumab en la DMAE en función de los genotipos de los polimorfismos *RAD51B*, *TGFBR1* y *COL8A1*, el mecanismo por el que estos genotipos interactúan con la terapia anti-VEGF es todavía desconocido, por lo que serían necesarios realizar más estudios.

El estudio multivariante realizado para evaluar el efecto predictivo de cada una de las variables independientes reveló como variables significativas los antecedentes familiares y la cirugía oftalmológica previa de catarata como variables relacionadas significativamente con la respuesta individual al tratamiento antiangiogénico con ranibizumab.

Los antecedentes familiares de DMAE tienen un efecto significativo e indirecto en la ganancia de AV ($\beta = -0,099$, $p = 0,039$). Es decir, tener antecedentes familiares hace disminuir la ganancia de AV en 0,099 unidades con respecto a los pacientes sin antecedentes familiares. Este hecho reforzaría el papel importante de los factores genéticos en la respuesta a tratamiento antiangiogénico en la DMAE.

La cirugía previa de catarata en el ojo afectado por la NVC tiene también un efecto significativo e indirecto en la ganancia de AV ($\beta = -0,126$, $p = 0,001$). Es decir, dicha intervención hace disminuir la ganancia de AV en 0,126 unidades con respecto a los pacientes sin antecedentes de cirugía de catarata. Por otro lado, se ha descrito que la cirugía de la catarata es un factor de riesgo para desarrollar NVC en pacientes con estadios iniciales de DMAE (39, 243) ya que la eliminación del cristalino deja a la mácula más expuesta al posible daño inducido por la luz. Esta cirugía podría tener un efecto directo sobre la progresión de la DMAE ya que el ojo afectado puede ser más vulnerable al trauma quirúrgico por estar dañada la membrana de Bruch. La inflamación ocasionada por la cirugía podría provocar un estímulo angiogénico adicional. Se ha reportado que en un 10-20% de los casos de cirugía de cataratas sin incidencias se produce edema macular subclínico que podría facilitar el desarrollo de NVC (244).

Según estos resultados, se recomendaría a los oftalmólogos ser restrictivos a la hora de someter a cirugía de cataratas a pacientes con DMAE. Sin embargo, hay estudios contradictorios respecto al hecho de que la cirugía de catarata influye en el desarrollo de NVC. Así, los estudios poblacionales *Visual Impairment Project* y *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS) indican que la cirugía de cataratas no incrementa el riesgo de progresión a DMAE severa (245, 246). Por otra parte, en el estudio AREDS, se realizó la intervención quirúrgica a 1244 pacientes (1939 ojos) que presentaban DMAE con diferente grado de severidad determinado mediante funduscopia. En general, todos los pacientes ganaron agudeza visual después de la intervención y la ganancia se mantuvo durante al menos 18 meses.

Con nuestros resultados se remarca que, aunque los resultados de estudios previos sean contradictorios, hay que evaluar individualmente a cada paciente que presenta DMAE y que va a ser intervenido de catarata.

La identificación de pacientes con genotipos de riesgo y formas iniciales de DMAE que van a ser intervenidos de catarata podría ser beneficiosa en el despistaje de las formas tempranas de esta enfermedad y, de este modo, prevenir su aparición con estilos de vida apropiados sin hábito tabáquico, con ingesta de alimentos o suplementos nutricionales ricos en antioxidantes y tratamiento de estadios tempranos de enfermedad.

Smailhodzic y colaboradores mostraron en el año 2012 que los genotipos de riesgo en los polimorfismos de los genes *CFH*, *ARMS2* y *VEGFA* tenían un efecto en la edad de aparición de la DMAE. Así, la combinación de los alelos de riesgo en estos genes implicaba la necesidad de tratamiento con ranibizumab en pacientes con DMAE diez años antes de la media así como una peor respuesta al tratamiento con ranibizumab. Estos pacientes con los 6 alelos de riesgo experimentaban una pérdida de visión de hasta 10 líneas en la escala EDTRS, concluyendo que hay un efecto acumulativo en los alelos de riesgo de DMAE (247). En nuestro estudio multivariante no hemos encontrado asociación entre los genotipos y la edad de aparición de la NVC ni en la edad de aparición de la DMAE en la respuesta al tratamiento.

En el presente trabajo no se ha encontrado asociación entre la edad, ajustada en base a la genética, y una peor respuesta a tratamiento. Ello sugiere que la edad no tiene un efecto sobre la respuesta a tratamiento cuando consideramos las variables genéticas de los pacientes. En su estudio, Dikmetsas y colaboradores (240), obtuvieron un resultado parecido al nuestro. En cualquier caso, se debe indicar que es posible que los pacientes no respondedores padeciesen estadios más avanzados o más agresivos de la enfermedad y por ello presentaron una peor respuesta tratamiento o un resultado negativo en el estudio farmacogenético, pero estos factores no se tuvieron en cuenta en nuestro estudio.

La tasa de respuesta de nuestro estudio fue baja, de 50,8%. Hay que destacar que nuestra área de salud pertenece a un medio rural, con una población muy envejecida y con un difícil acceso al hospital por la dispersión de la zona geográfica y por el nivel cultural de la sociedad. También hay que señalar que los criterios de respuesta han sido estrictos en cuanto a la ganancia de AV y la reducción de espesor macular, no considerando como una opción la respuesta parcial a tratamiento. Dikmetsas y colaboradores (240) obtuvieron una tasa de respuesta similar a la nuestra, de 49,75%.

Nuestro estudio muestra la influencia de los polimorfismos *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304) en la respuesta al tratamiento con ranibizumab intravítreo en la NVC. Los resultados obtenidos apoyan la importancia de los estudios de susceptibilidad genética a padecer la DMAE. De este modo, las personas con riesgo de enfermedad pueden recibir un tratamiento preventivo y así retener la función visual por períodos de tiempo más largos. Se conseguiría, así, mejorar la calidad de vida de los pacientes con DMAE e incrementaríamos la prevención realizando consejo genético en poblaciones susceptibles.

La identificación de nuevos genes implicados podría ayudar a desarrollar un mayor número de dianas terapéuticas específicas de esta enfermedad. Por otro lado, la heterogénea respuesta al tratamiento se ha atribuido parcialmente a variaciones genéticas, con lo que se demuestra la necesidad de biomarcadores predictivos que podrían coincidir en algunos casos con los genes de susceptibilidad a padecer la enfermedad.

VIII - CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. Existe una relación entre los factores genéticos y la respuesta a tratamiento antiangiogénico en pacientes con DMAE.
2. Los polimorfismos en los genes *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735) *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855), *TGFBR1* (rs334353) y *RAD51B* (rs8017304) no tienen efecto en la susceptibilidad a padecer DMAE en nuestra población.
3. Los pacientes con el alelo A de polimorfismo *RAD51B* (rs8017304) precisan un mayor número de inyecciones en el tratamiento de la NVC asociada a la DMAE.
4. El genotipo TT en el polimorfismo *TGFBR1* (rs334353) se relaciona una peor AV postratamiento con ranibizumab intravítreo en pacientes con DMAE.
5. La presencia del alelo T en el polimorfismo *COL8A1L/FILIP1L* (rs13081855) implica una peor respuesta a tratamiento por una menor reducción del espesor macular.
6. Los polimorfismos en el gen *ADAMTS9/ADAMTS9-AS2* (rs6795735) no están relacionados con la respuesta a tratamiento antiangiogénico con ranibizumab en pacientes con NVC asociada a DMAE.
7. La fecha crítica para valoración de la respuesta a tratamiento deben ser los seis meses sin la necesidad de prolongarla al año del inicio del tratamiento.
8. Se confirma la asociación existente entre la cirugía de catarata y la posterior aparición de formas de DMAE neovascular.
9. El desarrollo de la DMAE también se asocia con antecedentes familiares de esta patología.
10. En el presente trabajo no se ha encontrado asociación entre la edad, ajustada en base a la genética, y una peor respuesta a tratamiento. Tampoco se ha encontrado asociación están con otros factores como el sexo, la diabetes, la hipertensión o la enfermedad cardiovascular.

**IX – LIMITACIONES Y
FUTURAS LÍNEAS DE
INVESTIGACIÓN**

IX – LIMITACIONES

1. Muchos de los pacientes de nuestro estudio no son pacientes naïve y procedían de retratamientos previos al inicio del estudio.
2. Se trata de un estudio retrospectivo.
3. El tamaño muestral de nuestro estudio es relativamente bajo.
4. No se ha considerado la asociación de otros factores tóxicos como consumo de alcohol o tabaco en este ensayo.
5. No se tuvo en cuenta la severidad de la enfermedad.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Uno de los aspectos de la genética y los estudios farmacogenéticos es la elevada tasa de datos preliminares que pueden determinar el éxito de los tratamientos entre los que se incluye la terapia antiangiogénica para la DMAE. El descubrimiento de estos determinantes farmacogenéticos nos abre una puerta al estudio de mecanismos biológicos implicados en la patogenia de esta enfermedad como son los distintos polimorfismos genéticos. Dicho estudio se debería hacer en cultivos celulares o en modelos animales mediante ensayos funcionales que estudiaran como afecta la angiogénesis o los marcadores de éste en función del genotipo de los polimorfismos estudiados con implicación farmacogenética.

Es probable que en 5-10 años la elección del fármaco o posología para tratar en pacientes con DMAE esté guiada por estudio genético previo del paciente. Por ejemplo, se tendrá en cuenta hacer más revisiones o poner más inyecciones intravítreas en pacientes con un genotipo que implique una peor respuesta al tratamiento. El abaratamiento en los costes de la secuenciación masiva o de próxima generación hará posible el estudio de exoma completo y de todos aquellos polimorfismos con implicaciones farmacogenéticas en el manejo clínico de la DMAE.

Se hace necesaria la realización de estudios farmacogenéticos coste/efectivos para valorar el tipo de tratamiento según genotipo para cada paciente. A día de hoy, la pauta de tratamiento que se requiere para fármacos con ranibizumab es demasiado costosa e incómoda para el tipo de pacientes afectados de DMAE. Es preciso realizar estudios con fármacos o con pautas de tratamiento más flexibles para garantizar la sostenibilidad de los sistemas sanitarios cada vez más endeudados.

X - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

X - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Graue Wiechers E. Oftalmología en la práctica médica general. Interamericana-McGraw-Hill, editor. México D.F.; 1994.
2. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR, Gutiérrez A, Vasallo L, Fontán F, et al. Moore / anatomía con orientación clínica. Wolters Kluwer Health; 2013.
3. Teus Guezala MA. Guía Práctica de Oftamología. Entralgo AL, editor. Madrid; 2005.
4. Ryan A, Schachat S. Degeneración macular asociada a la edad. Cap. 60, sección xv. In.
5. Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B TA. Anatomofisiología de la úvea posterior: coroides. In: Prous science, editor. Degeneración macular asociada a la edad. Barcelona; 2005. p. 1-28.
6. Krachmer J. Los requisitos en Oftalmología: Retina, coroides y vítreo. Elsevier, editor. Madrid;
7. Bhutto I, Luty G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. Mol Aspects Med. 2012 Aug;33(4):295-317.
8. Sung C-H, Chuang J-Z. The cell biology of vision. J Cell Biol. The Rockefeller University Press; 2010 Sep 20;190(6):953-63.
9. Bowling B. Kanski: Oftalmología Clínica. Clinical Ophthalmology. A systematic approach. 2016.
10. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. Curr Mol Med. 2010;10(9):802-23.

11. Abad L. La mácula, cambios degenerativos. Ed. Glosa, editor.
12. Haab O. Atlas und Grundriss der Ophthalmoskopie und ophthalmoskopischen Diagnostik. Munich; 1885.
13. Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960). 1973 Sep;90(3):206-17.
14. Klein R, Meuer SM, Moss SE, Klein BE. Detection of drusen and early signs of age-related maculopathy using a nonmydriatic camera and a standard fundus camera. Ophthalmology. 1992 Nov;99(11):1686-92.
15. Schauwvlieghe AME, Dijkman G, Hooymans JM, Verbraak FD, Hoyng CB, Dijkgraaf MGW, et al. Comparing the Effectiveness of Bevacizumab to Ranibizumab in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration. The BRAMD Study. PLoS One. 2016 Jan;11(5):e0153052.
16. Olea JL, Aragón JA, Zapata ME, Tur JA. [Characteristics of patients with wet age-related macular degeneration and low intake of lutein and zeaxanthin]. Arch la Soc Española Oftalmol. 2012 Apr;87(4):112-8.
17. National Center for Health Statistics: Plan and Operation of the Health and Nutrition Examination Survey. United States 1971-1973. Rockville, MD: National Center for Health Statistics, 1973. Vital and Health statistics. Series 1, No. 10a. DHEW Pub. No. 79.
18. Kahn HA, Leibowitz HM, Ganley JP, Kini MM, Colton T, Nickerson RS, et al. The Framingham Eye Study. I. Outline and major prevalence findings. Am J Epidemiol. 1977 Jul;106(1):17-32.
19. Bressler NM, Bressler SB, West SK, Fine SL, Taylor HR. The grading and prevalence of macular degeneration in Chesapeake Bay watermen. Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960). 1989 Jun;107(6):847-52.
20. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology. 1992 Jun;99(6):933-43.

21. Vingerling JR, Dielemans I, Hofman A, Grobbee DE, Hijmering M, Kramer CF, et al. The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology*. 1995 Feb;102(2):205-10.
22. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1995 Oct;102(10):1450-60.
23. Klein R, Davis MD, Magli YL, Segal P, Klein BE, Hubbard L. The Wisconsin age-related maculopathy grading system. *Ophthalmology*. 1991 Jul;98(7):1128-34.
24. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*. 39(5):367-74.
25. Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013 Apr;120(4):844-51.
26. Schmitz-Valckenberg S, Sahel J-A, Danis R, Fleckenstein M, Jaffe GJ, Wolf S, et al. Natural History of Geographic Atrophy Progression Secondary to Age-Related Macular Degeneration (Geographic Atrophy Progression Study). *Ophthalmology*. 2016 Feb;123(2):361-8.
27. Yannuzzi LA, Negrão S, Iida T, Carvalho C, Rodriguez-Coleman H, Slakter J, et al. Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina*. 2001;21(5):416-34.
28. Yannuzzi LA, Sorenson J, Spaide RF, Lipson B. Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy (IPCV). *Retina*. 1990;10(1):1-8.
29. Rudolf M, Malek G, Messinger JD, Clark ME, Wang L, Curcio CA. Sub-retinal drusenoid deposits in human retina: organization and composition. *Exp Eye Res*. 2008 Nov;87(5):402-8.

30. McLeod DS, Grebe R, Bhutto I, Merges C, Baba T, Luty GA. Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Oct;50(10):4982-91.
31. Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* [Internet]. 1993 Oct;100(10):1519-35.
32. Green WR. Histopathology of age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 1999 Nov 3;5:27.
33. Al-Hussaini H, Schneiders M, Lundh P, Jeffery G. Drusen are associated with local and distant disruptions to human retinal pigment epithelium cells. *Exp Eye Res.* 2009 Mar;88(3):610-2.
34. Choudhury F, Varma R, McKean-Cowdin R, Klein R, Azen SP, Eong KA, et al. Risk Factors for Four-Year Incidence and Progression of Age-Related Macular Degeneration: The Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol.* Elsevier; 2011 Sep;152(3):385-95.
35. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology.* 1999 Jun;106(6):1049-55.
36. Vingerling JR, Dielemans I, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol.* 1995 Aug 15;142(4):404-9.
37. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology.* 2000 Dec;107(12):2224-32.
38. Seddon JM, Willett WC, Speizer FE, Hankinson SE. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. *JAMA.* 1996;276(14):1141-6.

39. Nagai N, Kubota S, Tsubota K, Ozawa Y. Resveratrol prevents the development of choroidal neovascularization by modulating AMP-activated protein kinase in macrophages and other cell types. *J Nutr Biochem*. 2014 Nov;25(11):1218-25.
40. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2001 Oct;119(10):1439-52.
41. AREDS2 Research Group, Chew EY, Clemons T, SanGiovanni JP, Danis R, Domalpally A, et al. The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2): study design and baseline characteristics (AREDS2 report number 1). *Ophthalmology*. 2012 Nov;119(11):2282-9.
42. Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BEK, Knudtson MD. Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2004 May;122(5):750-7.
43. Sui G-Y, Liu G-C, Liu G-Y, Gao Y-Y, Deng Y, Wang W-Y, et al. Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol*. 2013 Apr;97(4):389-94.
44. Pollack A, Marcovich A, Bukelman A, Oliver M. Age-related macular degeneration after extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation. *Ophthalmology*. 1996 Oct;103(10):1546-54.
45. Vingerling JR, Dielemans I, Witteman JC, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. Macular degeneration and early menopause: a case-control study. *BMJ*. 1995 Jun 17;310(6994):1570-1.
46. Johnson L V, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH. The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 3;99(18):11830-5.

47. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson L V. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol*. 2002 Sep;134(3):411-31.
48. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY, Rosenfeld P, et al. Age-related macular degeneration. *Lancet (London, England)*. Elsevier; 2012 May 5;379(9827):1728-38.
49. Forest DL, Johnson L V, Clegg DO. Cellular models and therapies for age-related macular degeneration. *Dis Model Mech*. 2015 May;8(5):421-7.
50. Ding X, Patel M, Chan C-C. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28(1):1-18.
51. Tang N-P, Zhou B, Wang B, Yu R-B. HTRA1 promoter polymorphism and risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis. *Ann Epidemiol*. Elsevier; 2009 Oct 1;19(10):740-5.
52. Pujol-Lereis LM, Schäfer N, Kuhn LB, Rohrer B, Pauly D. Interrelation Between Oxidative Stress and Complement Activation in Models of Age-Related Macular Degeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2016;854:87-93.
53. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2004 Apr;122(4):598-614.
54. van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, Ye W. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *J Pathol*. 2014 Jan;232(2):151-64.
55. Barbarroja N, Arístides-Torres L, Hernandez V, Martín C, Dorado G, Torres A, et al. Coordinated deregulation of cellular receptors, proangiogenic factors and intracellular pathways in acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 2007 Jun;48(6):1187-99.
56. de Jong PTVM. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5;355(14):1474-85.

57. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005 Jul;85(3):845–81.
58. Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci.* Springer International Publishing; 2016;73(9):1765–86.
59. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:158–69.
60. Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci [Internet].* 2016 May 6;73(9):1765–86.
61. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Jun 15;161(2):851–8.
62. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983 Feb 25;219(4587):983–5.
63. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 2001;106(4):148–56.
64. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest.* 2004 Apr;113(7):1040–50.
65. Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, et al. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Jun 15;193(2):631–8.
66. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group;* 2010;16(10):1107–11.

67. Wells JA, Murthy R, Chibber R, Nunn A, Molinatti PA, Kohner EM, et al. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. *Br J Ophthalmol*. 1996 Apr;80(4):363-6.
68. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
69. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1996 Aug;114(8):964-70.
70. Fernández-Vega Sanz, Alvaro; Villota Deleu E. Nuevos tratamientos en la neovascularización de la degeneración macular asociada a la edad. In: *Patología y cirugía de la mácula. Oftalmoseo*; 2010.
71. Baffi J, Byrnes G, Chan CC, Csaky KG. Choroidal neovascularization in the rat induced by adenovirus mediated expression of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Oct;41(11):3582-9.
72. Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE, Ross R, Glomset J, Kariya B, et al. Biology of Platelet-Derived Growth Factor and Its Involvement in Disease. *Mayo Clin Proc. Elsevier*; 2006 Sep;81(9):1241-57.
73. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*. 1998 May;125(9):1591-8.
74. Hangai M, Murata T, Miyawaki N, Spee C, Lim JI, He S, et al. Angiopoietin-1 upregulation by vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Jun;42(7):1617-25.
75. Kamizuru H, Kimura H, Yasukawa T, Tabata Y, Honda Y, Ogura Y. Monoclonal antibody-mediated drug targeting to choroidal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Oct;42(11):2664-72.

76. Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, Miyamoto H, Honda Y, Ikada Y, et al. Active drug targeting with immunoconjugates to choroidal neovascularization. *Curr Eye Res.* 2000 Dec;21(6):952-61.
77. Moore DJ, Hussain AA, Marshall J. Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995 Jun;36(7):1290-7.
78. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology.* 1991 May;98(5 Suppl):766-85.
79. Minuto de arco - Wikipedia, la enciclopedia libre.
80. AMSLER M. Earliest symptoms of diseases of the macula. *Br J Ophthalmol.* 1953 Sep;37(9):521-37.
81. Shah AR, Del Priore L V. Natural History of Predominantly Classic, Minimally Classic, and Occult Subgroups in Exudative Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2009;116(10):1901-7.
82. Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina.* 2006 Oct;26(8):859-70.
83. Kuehlewein L, Bansal M, Lenis TL, Iafe NA, Sadda SR, Bonini Filho MA, et al. Optical Coherence Tomography Angiography of Type 1 Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol.* Elsevier Inc.; 2015;160(4):739-748e2.
84. Ruiz-Moreno JM, Arias-Barquet L, Armadá-Maresca F, Boixadera-Espax A, García-Layana A, Gómez-Ulla-de-Irazazábal F, et al. Guidelines of clinical practice of the SERV: treatment of exudative age-related macular degeneration (AMD). *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2009 Jul;84(7):333-44.
85. Arnold JJ, Quaranta M, Soubrane G, Sarks SH, Coscas G. Indocyanine green angiography of drusen. *Am J Ophthalmol.* 1997 Sep;124(3):344-56.

86. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035):1178-81.
87. Hee MR, Izatt JA, Swanson EA, Huang D, Schuman JS, Lin CP, et al. Optical coherence tomography of the human retina. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1995 Mar;113(3):325-32.
88. Geitzenauer W, Hitzemberger CK, Schmidt-Erfurth UM. Retinal optical coherence tomography: past, present and future perspectives. *Br J Ophthalmol*. 2011 Feb;95(2):171-7.
89. Yeum K-J, Russell RM. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:483-504.
90. Richer S. ARMD--pilot (case series) environmental intervention data. *J Am Optom Assoc*. 1999 Jan;70(1):24-36.
91. Macular Photocoagulation Study group. Laser photocoagulation for juxtafoveal choroidal neovascularization. Five-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1994 Apr;112(4):500-9.
92. Bhatt NS, Al-Shirawi NM, Diamond JG. Krypton laser photocoagulation of peripapillary choroidal neovascular membrane. *Ophthalmic Surg Lasers*. 1999 Jan;30(1):56-8.
93. Lai TYY, Chan W-M, Lam DSC, Uyama M, Wada M, Nagai Y, et al. Laser photocoagulation of indocyanine green angiographically identified feeder vessels to idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol*. Elsevier; 2004 Oct;138(4):693-4.
94. Johnson TM, Glaser BM. Focal laser ablation of retinal angiomatous proliferation. *Retina*. 2006 Sep;26(7):765-72.
95. Roth DB, Scott IU, Gloth JM, Green SN, Yarian DL, Wheatley M. Micropulsed laser photocoagulation and intravitreal triamcinolone acetonide injection for the treatment of retinal angiomatous proliferation. *Retina*. 27(9):1201-4.

96. Merrill PT, LoRusso FJ, Lomeo MD, Saxe SJ, Khan MM, Lambert HM, et al. Surgical removal of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. Elsevier; 1999 Apr;106(4):782-9.
97. Kokame GT, Yamaoka S, Yamamoka S. Subretinal surgery for peripapillary subretinal neovascular membranes. *Retina*. 25(5):564-9.
98. Pertile G, Claes C, Ferris FL, Group MPS, Machemer R, Steinhorst UH, et al. Macular translocation with 360 degree retinotomy for management of age-related macular degeneration with subfoveal choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol*. Elsevier; 2002 Oct;134(4):560-5.
99. Bressler NM, Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2001 Feb;119(2):198-207.
100. Verteporfin In Photodynamic Therapy Study group. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization—verteporfin in photodynamic thera. *Am J Ophthalmol*. 2001 May;131(5):541-60.
101. Gonzales CR, VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (V.I.S.I.O.N.) Clinical Trial Group. Enhanced efficacy associated with early treatment of neovascular age-related macular degeneration with pegaptanib sodium: an exploratory analysis. *Retina*. 25(7):815-27.
102. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Al. E, Owen CG, Fletcher AE, et al. Year 2 Efficacy Results of 2 Randomized Controlled Clinical Trials of Pegaptanib for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. Elsevier; 2006 Sep;113(9):1508.e1-1508.e25.

103. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 May;3(5):391–400.
104. Roisman L, Zhang Q, Wang RK, Gregori G, Zhang A, Chen CL, Durbin MK, An L, Stetson PF, Robbins G, Miller A, Zheng F RP. Optical Coherence Tomography Angiography of Asymptomatic Neovascularization in Intermediate Age-Related Macular Degeneration.
105. Costa RA, Jorge R, Calucci D, Cardillo JA, Melo LAS, Scott IU. Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): results of a phase 1 dose-escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Oct;47(10):4569–78.
106. Gaudreault J, Fei D, Beyer JC, Ryan A, Rangell L, Shiu V, et al. Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits. *Retina.* 27(9):1260–6.
107. Rosenfeld PJ, Heier JS, Hantsbarger G, Shams N, Group A-REDSR, Klein R, et al. Tolerability and efficacy of multiple escalating doses of ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* Elsevier; 2006 Apr;113(4):623.e1.
108. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006 Oct 5;355(14):1432–44.
109. Regillo CD, Brown DM, Abraham P, Yue H, Ianchulev T, Schneider S, et al. Randomized, Double-Masked, Sham-Controlled Trial of Ranibizumab for Neovascular Age-related Macular Degeneration: PIER Study Year 1. *Am J Ophthalmol.* Elsevier; 2008 Feb;145(2):239–248.e5.
110. Fung AE, Lalwani GA, Rosenfeld PJ, Dubovy SR, Michels S, Feuer WJ, et al. An Optical Coherence Tomography-Guided, Variable Dosing Regimen with Intravitreal Ranibizumab (Lucentis) for Neovascular Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol.* Elsevier; 2007 Apr;143(4):566–583.e2.

111. Holz FG, Amoaku W, Donate J, Guymer RH, Kellner U, Schlingemann RO, et al. Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: the SUSTAIN study. *Ophthalmology*. Elsevier; 2011 Apr;118(4):663-71.
112. Boyer DS, Heier JS, Brown DM, Francom SF, Ianchulev T, Rubio RG, et al. A Phase IIIb study to evaluate the safety of ranibizumab in subjects with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. Elsevier; 2009 Sep;116(9):1731-9.
113. Spaide R, Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R, et al. Ranibizumab According to Need: A Treatment for Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol*. Elsevier; 2007 Apr;143(4):679-80.
114. Singer MA, Awh CC, Sadda S, Freeman WR, Antoszyk AN, Wong P, et al. HORIZON: an open-label extension trial of ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. Elsevier; 2012 Jun;119(6):1175-83.
115. CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Ying G, Grunwald JE, Fine SL, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2011 May 19;364(20):1897-908.
116. Dixon JA, Oliver SCN, Olson JL, Mandava N. VEGF Trap-Eye for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Oct;18(10):1573-80.
117. Aflibercept: AVE 0005, AVE 005, AVE0005, VEGF Trap - Regeneron, VEGF Trap (R1R2), VEGF Trap-Eye. *Drugs R D*. 2008;9(4):261-9.
118. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012 Jun;15(2):171-85.

119. Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik J-F, Kaiser PK, Nguyen QD, et al. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. Elsevier; 2012 Dec;119(12):2537-48.
120. Kaiser PK, Ruitter DJ, Schlingemann RO, Westphal JR, Al. E, Ferrara N, et al. Antivascular Endothelial Growth Factor Agents and Their Development: Therapeutic Implications in Ocular Diseases. *Am J Ophthalmol*. Elsevier; 2006 Oct;142(4):660-668.e1.
121. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 Jan 11;356(2):125-34.
122. Kernt M, Staehler M, Stief C, Kampik A, Neubauer AS. Resolution of macular oedema in occult choroidal neovascularization under oral Sorafenib treatment. *Acta Ophthalmol*. 2008 Jun;86(4):456-8.
123. Diago T, Pulido JS, Molina JR, Collett LC, Link TP, Ryan EH. Ranibizumab combined with low-dose sorafenib for exudative age-related macular degeneration. *Mayo Clin Proc*. 2008 Feb;83(2):231-4.
124. O'Farrell A-M, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KWH, et al. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3597-605.
125. Takahashi H, Obata R, Tamaki Y. A novel vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor, SU11248, suppresses choroidal neovascularization in vivo. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2006 Aug;22(4):213-8.
126. Tolentino MJ, Dennrick A, John E, Tolentino MS. Drugs in Phase II clinical trials for the treatment of age-related macular degeneration. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015 Feb;24(2):183-99.
127. Mroziewicz M, Tyndale RF. Pharmacogenetics: a tool for identifying genetic factors in drug dependence and response to treatment. *Addict Sci Clin Pract*. 2010 Dec;5(2):17-29.

128. Daudén Tello E. Farmacogenética I. Concepto, historia, objetivos y áreas de estudio. *Actas Dermosifiliogr.* Elsevier; 2006 Dec;97(10):623-9.
129. Torrades S. Farmacogenética: La medicina a la carta. *Offarm* 2002; 21 (10): 126-130.
130. International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007 Oct 18;449(7164):851-61.
131. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):538-49.
132. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998 May 15;280(5366):1077-82.
133. Daudén E. Farmacogenética II. Métodos moleculares de estudio, bioinformática y aspectos éticos. *Actas Dermosifiliogr.* Elsevier; 2007;98(1):3-13.
134. MB SNiP Screen™ - Genetics.
135. Ameen M, Smith CH, Barker JNWN. Pharmacogenetics in clinical dermatology. *Br J Dermatol.* 2002 Jan;146(1):2-6.
136. Swaroop A, Branham KE, Chen W, Abecasis G. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum Mol Genet.* 2007 Oct 15;16 Spec No(R2):R174-82.
137. Assink JJM, Klaver CCW, Houwing-Duistermaat JJ, Wolfs RCW, van Duijn CM, Hofman A, et al. Heterogeneity of the genetic risk in age-related macular disease: a population-based familial risk study. *Ophthalmology.* Elsevier; 2005 Mar;112(3):482-7.

138. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2005 Mar;123(3):321-7.
139. Haddad S, Chen CA, Santangelo SL, Seddon JM, ____, ____, et al. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date. *Surv Ophthalmol*. Elsevier; 2005;51(4):316-63.
140. Seddon JM, Santangelo SL, Book K, Chong S, Cote J. A genomewide scan for age-related macular degeneration provides evidence for linkage to several chromosomal regions. *Am J Hum Genet*. 2003 Oct;73(4):780-90.
141. Weeks DE, Conley YP, Tsai H-J, Mah TS, Schmidt S, Postel EA, et al. Age-related maculopathy: a genomewide scan with continued evidence of susceptibility loci within the 1q31, 10q26, and 17q25 regions. *Am J Hum Genet*. 2004 Aug;75(2):174-89.
142. Iyengar SK, Song D, Klein BEK, Klein R, Schick JH, Humphrey J, et al. Dissection of genomewide-scan data in extended families reveals a major locus and oligogenic susceptibility for age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*. 2004 Jan;74(1):20-39.
143. Fritsche LG, Igl W, Bailey JNC, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet*. 2016 Feb;48(2):134-43.
144. Hageman GS, Anderson DH, Johnson L V, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 17;102(20):7227-32.
145. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet*. 2005 Nov 1;14(21):3227-36.

146. Markiewski MM, Lambris JD, Bordet J, Gengou O, Carroll M, Mastellos D, et al. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol. Elsevier*; 2007 Sep;171(3):715-27.
147. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1058-66.
148. Varela JC, Tomlinson S. Complement: an overview for the clinician. *Hematol Oncol Clin North Am. NIH Public Access*; 2015 Jun;29(3):409-27.
149. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Apr 12;344(15):1140-4.
150. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, 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(2):95-112.
151. Clark SJ, Perveen R, Hakobyan S, Morgan BP, Sim RB, Bishop PN, et al. Impaired binding of the age-related macular degeneration-associated complement factor H 402H allotype to Bruch's membrane in human retina. *J Biol Chem*. 2010 Sep 24;285(39):30192-202.
152. Rodríguez de Córdoba S, Harris CL, Morgan BP, Llorca O. Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jan;1812(1):12-22.
153. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, 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(2):95-112.
154. Hakobyan S, Harris CL, van den Berg CW, Fernandez-Alonso MC, de Jorge EG, de Cordoba SR, et al. Complement factor H binds to denatured rather than to native pentameric C-reactive protein. *J Biol Chem*. 2008 Nov 7;283(45):30451-60.

155. Johnson PT, Betts KE, Radeke MJ, Hageman GS, Anderson DH, Johnson L V. Individuals homozygous for the age-related macular degeneration risk-conferring variant of complement factor H have elevated levels of CRP in the choroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 14;103(46):17456–61.
156. Nonyane BAS, Nitsch D, Whittaker JC, Sofat R, Smeeth L, Chakravarthy U, et al. An ecological correlation study of late age-related macular degeneration and the complement factor H Y402H polymorphism. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 May;51(5):2393–402.
157. Ryu E, Fridley BL, Tosakulwong N, Bailey KR, Edwards AO. Genome-wide association analyses of genetic, phenotypic, and environmental risks in the age-related eye disease study. *Mol Vis*. 2010;16:2811–21.
158. Thakkestian A, Han P, McEvoy M, Smith W, Hoh J, Magnusson K, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006 Sep 15;15(18):2784–90.
159. Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Br J Ophthalmol*. 2009 May;93(5):610–3.
160. Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006 Sep;38(9):1055–9.
161. Katta S, Kaur I, Chakrabarti S. The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview. *J Genet*. 2009 Dec;88(4):425–49.
162. Hagstrom SA, Ying GS, Pauer GJT, Sturgill-Short GM, Huang J, Callanan DG, et al. Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the comparison of AMD treatments trials (CATT). *Ophthalmology*. American Academy of Ophthalmology; 2013;120(3):593–9.

163. Schmidt S, Hauser MA, Scott WK, Postel EA, Agarwal A, Gallins P, et al. Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet.* Elsevier; 2006 May;78(5):852-64.
164. Fritsche LG, Loenhardt T, Janssen A, Fisher SA, Rivera A, Keilhauer CN, et al. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nat Genet.* 2008 Jul;40(7):892-6.
165. Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KEH, Brooks M, Khanna R, et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 9;104(41):16227-32.
166. Kortvely E, Hauck SM, Duetsch G, Gloeckner CJ, Kremmer E, Alge-Priglinger CS, et al. ARMS2 is a constituent of the extracellular matrix providing a link between familial and sporadic age-related macular degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jan;51(1):79-88.
167. Ting AYC, Lee TKM, MacDonald IM. Genetics of age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* 2009 Sep;20(5):369-76.
168. Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science.* 2006 Nov 10;314(5801):992-3.
169. Swaroop A, Chew EY, Rickman CB, Abecasis GR. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:19-43.
170. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991 Dec;5(12):1806-14.

171. Boekhoorn SS, Isaacs A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PTVM, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study. *Ophthalmology*. Elsevier; 2008 Nov;115(11):1899-903.
172. Richardson AJ, Islam FMA, Guymer RH, Cain M, Baird PN. A tag-single nucleotide polymorphisms approach to the vascular endothelial growth factor-A gene in age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2007;13:2148-52.
173. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006 Oct 1;15(19):2955-61.
174. Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, et al. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jan;47(1):329-35.
175. Lin J-M, Wan L, Tsai Y-Y, Lin H-J, Tsai Y, Lee C-C, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms in Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol*. Elsevier; 2008 Jun;145(6):1045-1051.e2.
176. Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J, et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol*. 2009;87(3):234-8.
177. Lambert NG, ElShelmani H, Singh MK, Mansergh FC, Wride MA, Padilla M, et al. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2016;
178. Fang AM, Lee AY, Kulkarni M, Osborn MP, Brantley MA. Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2009;15:2710-9.

179. Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem*. 1995 Jun 16;270(24):14313-8.
180. Soboleva G, Geis B, Schrewe H, Weber BHF. Sorsby fundus dystrophy mutation Timp3(S156C) affects the morphological and biochemical phenotype but not metalloproteinase homeostasis. *J Cell Physiol*. 2003 Oct;197(1):149-56.
181. Kamei M, Hollyfield JG. TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Sep;40(10):2367-75.
182. Chen W, Stambolian D, Edwards AO, Branham KE, Othman M, Jakobsdottir J, et al. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7401-6.
183. Stone EM, Braun TA, Russell SR, Kuehn MH, Lotery AJ, Moore PA, et al. Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004 Jul 22;351(4):346-53.
184. Fisher SA, Rivera A, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, et al. Case-control genetic association study of fibulin-6 (FBLN6 or HMCN1) variants in age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mutat*. 2007 Apr;28(4):406-13.
185. Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, Sobrin L, Parker M, Raychaudhuri S, et al. Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7395-400.
186. Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Oct;24(10):1750-4.

187. Seddon JM, Reynolds R, Yu Y, Rosner B. Three New Genetic Loci (R1210C in CFH, Variants in COL8A1 and RAD51B) Are Independently Related to Progression to Advanced Macular Degeneration.
188. Sivaprasad S, Bailey TA, Chong VNH. Bruch's membrane and the vascular intima: is there a common basis for age-related changes and disease? *Clin Experiment Ophthalmol*. 2005 Oct;33(5):518-23.
189. Klaver CC, Kliffen M, van Duijn CM, Hofman A, Cruys M, Grobbee DE, et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*. Elsevier; 1998 Jul;63(1):200-6.
190. Schmidt S, Klaver C, Saunders A, Postel E, De La Paz M, Agarwal A, et al. A pooled case-control study of the apolipoprotein E (APOE) gene in age-related maculopathy. *Ophthalmic Genet*. 2002 Dec;23(4):209-23.
191. Baird PN, Guida E, Chu DT, Vu HT V, Guymer RH. The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 May;45(5):1311-5.
192. Thakkinstian A, Bowe S, McEvoy M, Smith W, Attia J. Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2006 Nov 1;164(9):813-22.
193. Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, Thorleifsson G, et al. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2013 Apr;45(4):433-9, 439-2.
194. Lo PHY, Lung HL, Cheung AKL, Apte SS, Chan KW, Kwong FM, et al. Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*. 2010 Jul 1;70(13):5567-76.
195. Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 May;2(5):a006627.

196. Koo B-H, Coe DM, Dixon LJ, Somerville RPT, Nelson CM, Wang LW, et al. ADAMTS9 is a cell-autonomously acting, anti-angiogenic metalloprotease expressed by microvascular endothelial cells. *Am J Pathol.* Elsevier; 2010 Mar;176(3):1494-504.
197. De Jong EK, Breukink MB, Schellevis RL, Bakker B, Mohr JK, Fauser S, et al. Chronic central serous chorioretinopathy is associated with genetic variants implicated in age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* Elsevier Inc; 2015;122(3):562-70.
198. Whitmore SS, Braun TA, Skeie JM, Haas CM, Sohn EH, Stone EM, et al. Altered gene expression in dry age-related macular degeneration suggests early loss of choroidal endothelial cells. *Mol Vis.* 2013;19:2274-97.
199. Helisalimi S, Immonen I, Losonczy G, Resch MD, Benedek S, Balogh I, et al. ADAMTS9 locus associates with increased risk of wet AMD. *Acta Ophthalmol.* 2014 Aug;92(5):e410.
200. Seddon JM, Reynolds R, Yu Y, Rosner B. Three new genetic loci (R1210C in CFH, variants in COL8A1 and RAD51B) are independently related to progression to advanced macular degeneration. *PLoS One.* 2014;9(1):e87047.
201. Tamura Y, Konomi H, Sawada H, Takashima S, Nakajima A. Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991 Aug;32(9):2636-44.
202. Hou M, Möller S, Edvinsson L, Erlinge D. Cytokines induce upregulation of vascular P2Y(2) receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Sep;20(9):2064-9.
203. Tan ST, Wallis RA, He Y, Davis PF. Mast cells and hemangioma. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Mar;113(3):999-1011.
204. Kwon M, Hanna E, Lorang D, He M, Quick JS, Adem A, et al. Functional characterization of filamin a interacting protein 1-like, a novel candidate for antivascular cancer therapy. *Cancer Res.* 2008 Sep 15;68(18):7332-41.

205. Kwon M, Lee SJ, Reddy S, Rybak Y, Adem A, Libutti SK. Down-regulation of Filamin A interacting protein 1-like Is associated with promoter methylation and an invasive phenotype in breast, colon, lung and pancreatic cancers [corrected]. *PLoS One*. 2013;8(12):e82620.
206. Masli S, Sheibani N, Cursiefen C, Zieske J. Matricellular protein thrombospondins: influence on ocular angiogenesis, wound healing and immunoregulation. *Curr Eye Res*. 2014 Aug;39(8):759-74.
207. Issbrücker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, et al. p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J*. 2003 Feb;17(2):262-4.
208. Radeke MJ, Radeke CM, Shih Y-H, Hu J, Bok D, Johnson L V, et al. Restoration of mesenchymal retinal pigmented epithelial cells by TGF β pathway inhibitors: implications for age-related macular degeneration. *Genome Med*. 2015;7(1):58.
209. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M, Degeneration A status and neovascular age-related macular, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. Elsevier; 1993;45(2):115-34.
210. Chu XK, Meyerle CB, Liang X, Chew EY, Chan C-C, Tuo J. In-depth analyses unveil the association and possible functional involvement of novel RAD51B polymorphisms in age-related macular degeneration. *Age (Omaha)*. Springer Netherlands; 2014 Jun 14 [cited 2016 Aug 10];36(3):9627.
211. Suwaki N, Klare K, Tarsounas M. RAD51 paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(8):898-905.
212. Chu XK, Meyerle CB, Liang X, Chew EY, Chan C-C, Tuo J. In-depth analyses unveil the association and possible functional involvement of novel RAD51B polymorphisms in age-related macular degeneration. *Age (Dordr)*. 2014 Jun;36(3):9627.

213. Brantley MA, Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A. Association of Complement Factor H and LOC387715 Genotypes with Response of Exudative Age-Related Macular Degeneration to Intravitreal Bevacizumab. *Ophthalmology*. 2007;114(12):2168-73.
214. Nischler C, Oberkofler H, Ortner C, Paikl D, Riha W, Lang N, et al. Complement factor H Y402H gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2011;89(4):344-9.
215. Orlin A, Hadley D, Chang W, Ho AC, Brown G, Kaiser RS, et al. Association between high-risk disease loci and response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for wet age-related macular degeneration. *Retina*. 2012 Jan;32(1):4-9.
216. Teper SJ, Nowinska A, Pilat J, Palucha A, Wylegala E. Involvement of genetic factors in the response to a variable-dosing ranibizumab treatment regimen for age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2010;16:2598-604.
217. Chen H, Yu K Da, Xu GZ. Association between variant Y402H in age-related macular degeneration (AMD) susceptibility gene CFH and treatment response of AMD: A meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(8).
218. Kloeckener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S, Schindler C, Kurz-Levin M, Michels S, et al. Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jun;52(7):4694-702.
219. Smailhodzic D, Muether PS, Chen J, Kwestro A, Zhang AY, Omar A, et al. Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. *American Academy of Ophthalmology*; 2012;119(11):2304-11.
220. Agosta E, Lazzeri S, Orlandi P, Figus M, Fioravanti A, Di Desidero T, et al. Pharmacogenetics of antiangiogenic and antineovascular therapies of age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics*. 2012;13(9):1037-53.

221. Francis PJ. The influence of genetics on response to treatment with ranibizumab (Lucentis) for age-related macular degeneration: the Lucentis Genotype Study (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2011;109:115-56.
222. Smith W, Mitchell P. Family history and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1998 Aug;26(3):203-6.
223. Li F, Xu H, Zeng Y, Yin ZQ. Overexpression of fibulin-5 in retinal pigment epithelial cells inhibits cell proliferation and migration and downregulates VEGF, CXCR4, and TGF β 1 expression in cocultured choroidal endothelial cells. *Curr Eye Res.* 2012 Jun;37(6):540-8.
224. Cruz-Gonzalez F, Cabrillo-Estévez L, López-Valverde G, Cieza-Borrella C, Hernández-Galilea E, González-Sarmiento R. Predictive value of VEGF a and VEGFR2 polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet AMD. *Graefé's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014;252(3):469-75.
225. Hermann MM, Van Asten F, Muether PS, Smailhodzic D, Lichtner P, Hoyng CB, et al. Polymorphisms in vascular endothelial growth factor receptor 2 are associated with better response rates to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* American Academy of Ophthalmology; 2014;121(4):905-10.
226. Hagstrom SA, Ying G, Maguire MG, Martin DF, CATT Research Group, Gibson J, et al. VEGFR2 Gene Polymorphisms and Response to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2015 Aug;122(8):1563-8.
227. Wickremasinghe SS, Xie J, Lim J, Chauhan DS, Robman L, Richardson AJ, et al. Variants in the APOE gene are associated with improved outcome after anti-VEGF treatment for neovascular AMD. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4072-9.

228. Bakbak B, Ozturk BT, Zamani AG, Gonul S, Iyit N, Gedik S, et al. Association of Apolipoprotein E Polymorphism with Intravitreal Ranibizumab Treatment Outcomes in Age-Related Macular Degeneration. *Curr Eye Res.* 2016 Jun;41(6):862-6.
229. Oyster CW. *The Human Eye: Structure and Function.* Sinauer Associates, editor. Sunderland Massachusetts; 1999.
230. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology.* 1991 May;98(5 Suppl):786-806.
231. Rogers MS, D'Amato RJ. Common Polymorphisms in Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Nov 1;2(11):a006510-a006510.
232. Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005 Apr 15;308(5720):421-4.
233. Seitsonen SP, Jarvela IE, Meri S, Tommila P V, Ranta PH, Immonen IJ. The effect of complement factor H Y402H polymorphism on the outcome of photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *Eur J Ophthalmol* 2007;17(6):943-9.
234. Chen G, Tzekov R, Li W, Jiang F, Mao S, Tong Y. Pharmacogenetics of Complement Factor H Y402H Polymorphism and Treatment of Neovascular AMD with Anti-VEGF Agents: A Meta-Analysis. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2015;5(May):14517.
235. Shah AR, Williams S, Bauml CR, Rosner B, Duker JS, Seddon JM. Predictors of Response to Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2016 Mar;163:154-166.e8.

236. Seddon JM, Silver RE, Kwong M, Rosner B, Sed-Don JM. Risk Prediction for Progression of Macular Degeneration: 10 Common and Rare Genetic Variants, Demographic, Environmental, and Macular Covariates. *Clin Epidemiol Res.*
237. Veloso CEDR, de Almeida LNF, Recchia FM, Pelayes D, Nehemy MB. VEGF gene polymorphism and response to intravitreal ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 2014;51(1):1-8.
238. McKibbin M, Ali M, Bansal S, Baxter PD, West K, Williams G, et al. CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2012 Feb;96(2):208-12.
239. Abedi F, Wickremasinghe S, Richardson AJ, Makalic E, Schmidt DF, Sandhu SS, et al. Variants in the VEGFA gene and treatment outcome after anti-VEGF treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* Elsevier Inc.; 2013;120(1):115-21.
240. Dikmetas O, Kadayıfcılar S, Eldem B. The effect of CFH polymorphisms on the response to the treatment of age-related macular degeneration (AMD) with intravitreal ranibizumab. *Mol Vis* 2013;19(July):2571-8.
241. Velazquez-Villoria A, Recalde S, Anter J, Bezunartea J, Hernandez-Sanchez M, García-García L, et al. Evaluation of 10 AMD Associated Polymorphisms as a Cause of Choroidal Neovascularization in Highly Myopic Eyes. Langmann T, editor. *PLoS One.* 2016 Sep 19;11(9):e0162296.
242. Yu Y, Huang L, Wang B, Zhang C, Bai Y, Li X. COL8A1 rs13095226 polymorphism shows no association with neovascular age-related macular degeneration or polypoidal choroidal vasculopathy in Chinese subjects. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11635-40.
243. Ho L, Boekhoorn SS, Liana, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Hofman A, et al. Cataract surgery and the risk of aging macula disorder: the rotterdam study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Nov 1;49(11):4795-800.

244. Ursell PG, Spalton DJ, Whitcup SM, Nussenblatt RB. Cystoid macular edema after phacoemulsification: relationship to blood-aqueous barrier damage and visual acuity. *J Cataract Refract Surg.* 1999 Nov;25(11):1492-7.
245. McCarty CA, Mukesh BN, Fu CL, Mitchell P, Wang JJ, Taylor HR. Risk factors for age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 2001 Oct;119(10):1455-62.
246. Chew EY, Sperduto RD, Milton RC, Clemons TE, Gensler GR, Bressler SB, et al. Risk of advanced age-related macular degeneration after cataract surgery in the Age-Related Eye Disease Study: AREDS report 25. *Ophthalmology.* 2009 Feb;116(2):297-303.
247. Smailhodzic D, Muether PS, Chen J, Kwestro A, Zhang AY, Omar A, et al. Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology Elsevier;* 2012 Nov;119(11):2304-11.
248. Klein ML, Francis PJ, Rosner B, Reynolds R, Hamon SC, Schultz DW, et al. CFH and LOC387715/ARMS2 Genotypes and Treatment with Antioxidants and Zinc for Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2008 Jun;115(6):1019-25.

XI – ANEXOS

XI. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado la autorización para inyección de tratamiento intravítreo.



Hospital General Universitario Sta. Lucía
C/ Mezquita, s/n, Paraje Los Arcos,
30202, Santa Lucía, Cartagena
Teléfono: 968 12 86 00 (centralita)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

SERVICIO OFTALMOLOGÍA

Medico Responsable: Dr .

PROCEDIMIENTO: INYECCION INTRAVITREA DE RANIBIZUMAB/AFLIBERCEPT

D.Dª , en calidad de paciente o de su representante legal, con DNI nº , manifiesto haber sido informado por el Dr. , de los siguientes aspectos en relación a la administración intravítrea de medicamentos al que voy a someterme, como es legalmente preceptivo (art. 4.8,9 y 10 de Ley 41/2002):

A) Administración intravítrea de medicamentos

Este tipo de procedimiento consiste esencialmente, y de forma muy simplificada, en una inyección intraocular de un fármaco con dos finalidades principales: antiangiogénica y antiedematosa.

El objetivo de esta aplicación es controlar la pérdida de visión ocasionada por la enfermedad que sufre el paciente. Normalmente se aplica con anestesia local, tópica con gotas antes y después de la intervención.

B) Los riesgos y complicaciones típicas

Aunque este tipo de técnica habitualmente consigue el objetivo perseguido, y por eso le proponemos su realización, en las publicaciones científicas están descritas una serie de complicaciones típicas de esta técnica que usted debe conocer. Las más importantes son:

1. Aumento de la presión intraocular. Suele ser transitorio. Sólo en algunas ocasiones necesitaría tratamiento específico.
2. Hemorragia vítrea, en la mayoría de las ocasiones se puede resolver con tratamiento aunque en otros casos es necesaria una intervención quirúrgica para eliminarla.
3. Desprendimiento de retina, complicación que se da en muy raras ocasiones y que necesitaría una intervención quirúrgica para resolverla.
4. Endoftalmitis: se trata de una inflamación del globo ocular que puede estar relacionada con un proceso infeccioso o como respuesta al producto que se está inyectando.
5. Progresión de cataratas o aparición de ellas
6. Hemorragias, perforaciones de estructuras, hernia de iris, rotura capsular, luxación del núcleo que requiere realizar una vitrectomía. Una complicación muy infrecuente (2 por mil casos) pero extremadamente grave es una hemorragia expulsiva que consiste en la expulsión del contenido del ojo y conlleva la pérdida del mismo.

Alguna de estas complicaciones pueden llegar a ocasionar graves consecuencias, incluso en algunos casos puede llegar a comprometer la integridad del ojo.

C) Los riesgos particulares

Los principales estudios realizados para la evaluación de la acción de este medicamento, los estudios ANCHOR y MARINA, muestran que los pacientes tratados con Ranibizumab, no presentaron una incidencia superior de complicaciones cardiovasculares en relación a los no tratados con esta molécula.

Por lo tanto DECLARO:

· Que he sido informado con suficiente anticipación de este tratamiento como para poder comprender, sopesar y meditar todos estos aspectos, pudiendo plantear a los médicos las dudas o preguntas que he considerado oportunas.

· Que soy plenamente consciente de que me voy a someter a un tratamiento, y como tal, no existen garantías absolutas de éxito, asumiendo el riesgo de las eventuales complicaciones inherentes a dicha técnica y de las que he sido convenientemente informado.

· Que he comprendido perfectamente la información recibida y libremente doy mi consentimiento a este equipo del Servicio de Oftalmología del Hospital Stª María del Rosell para que realicen el tratamiento descrito.

En Cartagena, a

Firma del Paciente o su representante

Anexo 2. Consentimiento de autorización de utilización de datos clínicos y de material biológico excedente del proceso asistencial para investigación biomédica y conservación en biobanco de acuerdo con la Ley de Investigación Biomédica del 4 de julio de 2007.



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.3)

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

En el *Hospital General Universitario Santa Lucía*, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios

Solicitamos su autorización para incorporar al *Biobanc-Mur Nodo Área I* del hospital el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Seguendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se cederán generalmente sin información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

Muestras biológicas e información asociada: En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco *Biobanc-Mur Nodo Área II* del *Hospital General Universitario Santa Lucía* hasta su extinción. Este Biobanco forma parte como nodo de la Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III con la referencia RD09/0076/00065, y está en proceso de Registro con el desarrollo de la normativa regional de Biobancos que aplica la normativa nacional.

Este biobanco acoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.

Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética de la Investigación (CEI) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el comité científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco del Hospital podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Protección de datos y confidencialidad: *Las muestras se conservarán codificadas.*

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizados, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

*Responsable del fichero : Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.
Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia*

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia
Responsable del nodo Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia
Tel.: 968359757 E-mail: juamp.serna@ccrm.es

Carácter altruista de la donación. *La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital General Universitario Santa Lucía es gratuita.*

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

Participación voluntaria. *Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura*

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

Revocación del consentimiento: *si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.*

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Director del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

Información sobre los resultados de la investigación: *se le proporcionará información si usted desea recibirla*

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital General Universitario Santa Lucía* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área II*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Confirmo que:

1. Autoriza al *Hospital General Universitario Santa Lucía* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanc-Mur Nodo Área II*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

DONANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a.... de..... de.....





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del testigo que firma..... DNI.....

Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante confirma que el donante:

1. Autoriza al *Hospital General Universitario Santa Lucía* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanc-Mur Nodo Área II*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TESTIGO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del tutor legal que firma..... DNI.....
 Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital General Universitario Santa Lucía* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área II*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

El abajo firmante confirma que:

- Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.
 SI NO
- Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto:.....
- Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:
- He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

- Me autoriza a firmar en su nombre.

TUTOR	ASENTIMIENTO DEL MENOR CAPACITADO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma	Firma

En..... a..... de..... de.....





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

POR EL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI anulo el consentimiento prestado en fecha..... de..... de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área II**, que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En..... a..... de..... de 20.....

POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI, Como representante legal de D./Dña....., con DNI....., anulo el consentimiento prestado en fecha..... de..... de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área II**, que doy por finalizada al día de hoy.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En..... a..... de..... de 20.....



Anexo 3. Hoja de recogida de datos.

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS					
FECHA:			FACULTATIVO:		
SERVICIO: Oftalmología			CENTRO:		
DATOS DEL PACIENTE					
Nº HISTORIA:			INICIALES:		
FECHA NACIMIENTO:		PESO:	Kg	TALLA:	m
HABITOS DE VIDA:					
FUMADOR:					
BEBEDOR:					
ALIMENTACION:					
ANTECEDENTES FAMILIARES:					
ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR:					
OTROS:					
DM:					
HIPERTENSION:					
OTRAS ENFERMEDADES CONCOMITANTES:					
MEDICACIÓN ACTUAL					
TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE:					
TRATAMIENTO PREVIO PARA DMAE:					
CIRUGÍA DE CATARATA:					
EXPLORACIÓN OCULAR					
1. AV- OD	CC	CE	2. PIO.- OD		
OI	CC	CE	OI		
3. BMC.- OD					
OI					
4. FONDO DE OJO.- OD					
OI					
5. OCT.- OD			ESPESOR		
OI			ESPESOR		
¿Actividad MNV?					
6. DIAGNÓSTICO:	O.D	TIPO:	FECHA:		
	O.I	TIPO:	FECHA:		
7. OBSERVACIONES:					
OTRAS ALTERACIONES OCULARES:					
TERAPIA ANTIANGIOGÉNICA INTRAVÍTREA					

PROFILAXIS ANTIMICROBIANA:**FECHA1:**

AV1 OD OI

OCT1 OD
OI**OJO TRATADO:****TRATAMIENTO 1:****OBSERVACIONES1:****FECHA2:**

AV2 OD OI

OCT2 OD
OI**OJO TRATADO:****TRATAMIENTO 2:****OBSERVACIONES2:****FECHA3:**

AV3 OD OI

OCT3 OD
OI**OJO TRATADO:****TRATAMIENTO 3:****OBSERVACIONES3:****FECHA4:**

AV4 OD OI

OCT4 OD
OI**OJO TRATADO:****TRATAMIENTO 4:****OBSERVACIONES4:****DATOS RELATIVOS A LA EFICACIA:**

AV INICIAL:

AV ACTUAL:

OCT INICIAL:

OCT ACTUAL:

¿CAMBIA?

NUMERO TOTAL DE ADMINISTRACIONES:

EFFECTOS ADVERSOS: