

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA



DEGENERACIÓN MACULAR EXUDATIVA ASOCIADA A LA EDAD
RIESGO INDUCIDO POR FACOEMULSIFICACIÓN
E IMPACTO DE LOS GENES *CFH* Y *ARMS2* SOBRE
LA INCIDENCIA, DESARROLLO Y RESPUESTA
AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB INTRAVÍTREO

TESIS DOCTORAL DE:

ALICIA VALVERDE MEGÍAS

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**JULIÁN GARCÍA FEIJOÓ, JAVIER GARCÍA GIL DE BERNABÉ Y
ALICIA MEGÍAS FRESNO**

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Oftalmología

DEGENERACIÓN MACULAR EXUDATIVA ASOCIADA A LA EDAD
RIESGO INDUCIDO POR FACOEMULSIFICACIÓN
E IMPACTO DE LOS GENES *CFH* Y *ARMS2* SOBRE
LA INCIDENCIA, DESARROLLO Y RESPUESTA
AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB INTRAVÍTREO

Memoria presentada por
ALICIA VALVERDE MEGÍAS
para optar al Grado de Doctor
Madrid, Enero de 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Oftalmología



**DEGENERACIÓN MACULAR EXUDATIVA ASOCIADA A LA EDAD:
RIESGO INDUCIDO POR FACOEMULSIFICACIÓN
E IMPACTO DE LOS GENES *CFH* Y *ARMS2* SOBRE LA
INCIDENCIA, DESARROLLO Y RESPUESTA
AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB INTRAVÍTREO**

Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por

ALICIA VALVERDE MEGÍAS

Madrid, 2013

DEGENERACIÓN MACULAR EXUDATIVA ASOCIADA A LA EDAD: RIESGO INDUCIDO POR FACOEMULSIFICACIÓN E IMPACTO DE LOS GENES *CFH* Y *ARMS2* SOBRE LA INCIDENCIA, DESARROLLO Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB INTRAVÍTREO

Alicia Valverde Megías

Tesis Doctoral
Universidad Complutense de Madrid

Directores

Julián García Feijóo
Catedrático Oftalmología. UCM
Jefe del Servicio de Oftalmología
del Hospital Clínico San Carlos

Javier García Gil de Bernabé
Jefe del Servicio de Oftalmología
del Hospital Rey Juan Carlos

Alicia Megías Fresno
Catedrática de Bioquímica.
Facultad de Biología. UCM

Hospital Clínico San Carlos
Universidad Complutense, Madrid



Julián García Feijoó, Catedrático de Oftalmología del Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos, como director,

Javier García Gil de Bernabé, Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Rey Juan Carlos, como director,

y

Alicia Megías Fresno, Catedrática de Bioquímica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, como directora,

CERTIFICAN

Que la presente Memoria de Tesis titulada *“Degeneración macular exudativa asociada a la edad: Riesgo inducido por facoemulsificación e impacto de los genes CFH y ARMS2 sobre la incidencia, desarrollo y respuesta al tratamiento con ranibizumab intravítreo”* ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. Alicia Valverde Megías desde el año 2008 en el Departamento de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid. Hacemos constar que la citada Tesis reúne todos los requisitos necesarios para su defensa y aprobación.

Y, para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en

Madrid, a diecisiete de Enero de dos mil trece.

Julián García Feijoó

Catedrático Oftalmología. UCM
Jefe del Servicio de Oftalmología
del Hospital Clínico San Carlos

Javier García Gil de Bernabé

Jefe del Servicio de Oftalmología
del Hospital Rey Juan Carlos

Alicia Megías Fresno

Catedrática de Bioquímica.
Facultad de Biología. UCM



*“Si lloras por no poder ver el sol,
las lágrimas te impedirán ver las estrellas”*

R. Tagore

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más profundo y sentido para mi familia, en especial para mi madre, por su ejemplo de lucha y honestidad, por su paciencia, inteligencia y generosidad. Sin su apoyo como directora, esta Tesis no hubiera sido posible, ni tan siquiera probable.

Quiero extender mi sincero agradecimiento a Julián García Feijoo y Javier García Gil de Bernabé, directores de este trabajo, por el interés y ayuda que me han prestado en el desarrollo de esta Tesis, sus importantes aportaciones, y su apoyo y confianza en mi trabajo. No cabe duda de que su participación ha enriquecido el trabajo realizado.

Gracias a Juan Donate, de paciencia infinita, que depositó su confianza en mí, y posibilitó que este proyecto diera sus primeros pasos. A Juan Reche y Cristina Calvo, por compartir generosamente sus extensos conocimientos conmigo y por su incondicional dedicación a los pacientes afectados de degeneración macular. A Cristina Fernández, jefa del Departamento de Estadística del Hospital Clínico, por su colaboración en el diseño de los estudios que se presentan en esta Memoria. Mi más sincero agradecimiento a Rosa y a Cecilia, que me ayudaron con la recogida de muestras y que contribuyen a que la Unidad de Mácula sea un sitio agradable y más humano.

Gracias a Loreto y a Sara, mucho más que compañeras de profesión, que ayudaron no sólo de forma activa, sino también con el apoyo que siempre me muestran de manera incondicional.

A la Doctora Marisa Maestro y a sus colaboradoras (sus "niñas", en especial Silvia y Marta), de la Unidad de Genómica del Hospital Clínico, mi profunda gratitud por su inestimable y generosa ayuda en la determinación de los polimorfismos, por ayudarme a comprender esas técnicas tan poco conocidas por nosotros los oftalmólogos, y por su participación en la corrección de esta Memoria. Son un ejemplo de buen hacer y profesionalidad contra viento y marea.

Por su bondad, su generosidad y su paciencia, quedo inmensamente agradecida a Antonio Murciano, profesor titular del Departamento de Matemática Aplicada de la Facultad de Biología, que me ayudó en los complejos análisis estadísticos (nigromancia para mí hasta entonces) aportando luz en los momentos más decisivos.

Mi agradecimiento a todos los pacientes, sin cuya colaboración nada de esto tendría sentido.

Finalmente, deseo expresar mi gratitud a la Compañía Novartis Farmacéutica S.A. por la ayuda económica concedida a este proyecto que permitió la financiación de los análisis genéticos.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS	XIX
HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO	XXIII
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS	XXVII
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	XXXI
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (DMAE)	3
1.2.- ESTRUCTURAS OCULARES IMPLICADAS EN LA DMAE	5
1.2.1.- FOTORRECEPTORES	5
1.2.2.- EPITELIO PIGMENTARIO RETINIANO	6
1.2.3.- MEMBRANA DE BRUCH	9
1.2.4.- COROIDES	15
1.3.- FENOTIPOS Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA DMAE	20
1.3.1.- CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE DMAE	20
1.3.2.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO POR TÉCNICAS DE IMAGEN	25
1.3.3.- SINTOMATOLOGÍA	38
1.4.- FACTORES DE RIESGO	40
1.5.- CIRUGÍA DE CATARATAS COMO FACTOR PREDISPONENTE PARA LA DMAE	43
1.6.- GENÉTICA DE LA DMAE	45
1.6.1.- GENES CANDIDATOS	45
1.6.2.- EL FACTOR H DEL COMPLEMENTO Y SU RELACIÓN CON LA PATOGENESIS DE LA DMAE	50
1.6.3.- RELACIÓN DEL GEN <i>LOC387715/ARMS2</i> CON LA DMAE	58
1.7.- PREVENCIÓN Y TRATAMIENTOS	61
1.7.1.- PREVENCIÓN	61
1.7.2.- TRATAMIENTO DE LA DMAE NEOVASCULAR	64
1.7.2.1.- Fotocoagulación con láser-argón	64
1.7.2.2.- Terapia fotodinámica	64
1.7.2.3.- Técnicas quirúrgicas	65
1.7.2.4.- Dispositivos intraoculares	66
1.7.2.5.- Terapia antiangiogénica intravítrea	66
1.7.2.6.- Radioterapia	71
1.7.2.7.- Terapias combinadas	75
1.7.2.8.- Terapias en desarrollo	76
1.8.- VALOR TERAPÉUTICO DE RANIBIZUMAB EN LA DMAE NEOVASCULAR	77

1.9.- FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIANGIOGÉNICO	82
2.- OBJETIVOS	87
3.- SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES	93
3.1.1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO	93
3.1.2.- SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS	93
3.1.2.1.- Estudio de la influencia de la facoemulsificación sobre el desarrollo de neovascularización coroidea (E1)	94
3.1.2.2.- Estudio de la relación de los polimorfismos Y402H y A69S de los genes <i>CFH</i> y <i>LOC387715/ARMS2</i> con la incidencia de la DMAE exudativa (E2).....	95
3.1.2.3.- Estudio de la influencia de los polimorfismos Y402H y A69S de los genes <i>CFH</i> y <i>LOC387715/ARMS2</i> sobre la evolución de la DMAE exudativa y su respuesta al tratamiento con ranibizumab (<i>Lucentis</i> ®) (E3)	96
3.2.- METODOLOGÍA DE EXPLORACIÓN CLÍNICA	97
3.2.1.- TOMA DE AGUDEZA VISUAL	97
3.2.2.- RETINOGRAFÍA.....	97
3.2.3.- ANGIOGRAFÍA.....	98
3.2.4.- TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA DE DOMINIO ESPECTRAL (SD-OCT)	99
3.2.4.1.- Estudio de la reproducibilidad en las medidas de OCT.....	103
3.3.- METODOLOGÍA DE TRATAMIENTOS	104
3.3.1.- CIRUGÍA DE CATARATAS	104
3.3.2.- INYECCIONES INTRAVÍTREAS DE RANIBIZUMAB.....	105
3.4.- ANÁLISIS GENÉTICOS	106
3.4.1.- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DEL ADN	106
3.4.2.- CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN	107
3.4.3.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN	107
3.4.4.- COMPROBACIÓN DEL AMPLIFICADO	109
3.4.5.- DIGESTIÓN DEL AMPLIFICADO	110
3.4.6.- SECUENCIACIÓN	111
3.5.- TRATAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	113
4.- RESULTADOS	117
4.1.- REPRODUCIBILIDAD DE LA MEDIDA DEL ESPESOR RETINIANO CENTRAL MEDIANTE OCT	119
4.2.- VALORACIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL DE PACIENTES CONTROL Y CON DMAE INCIPIENTE TRAS FACOEMULSIFICACIÓN	124
4.2.1.- RESULTADOS DEL EXAMEN PREOPERATORIO	124

4.2.2.- EVOLUCIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL POSTOPERATORIA AL MES Y AL AÑO	130
4.3.- ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS Y402H (GEN <i>CFH</i>) Y A69S (GEN <i>LOC387715/ARMS2</i>) CON LA DMAE NEOVASCULAR EN PACIENTES DE LA COMUNIDAD DE MADRID	135
4.4.- INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS Y402H (GEN <i>CFH</i>) Y A69S (GEN <i>LOC387715/ARMS2</i>) SOBRE LA RESPUESTA FUNCIONAL AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB	140
4.4.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO	140
4.4.2.- RESULTADOS FUNCIONALES TRAS LA DOSIS DE CARGA CON RANIBIZUMAB	143
4.4.3.- RESULTADOS TRAS SEGUIMIENTO A UNO, DOS Y TRES AÑOS	146
4.4.4.- ASOCIACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS PARA LOS POLIMORFISMOS Y402H (<i>CFH</i>) Y A69S (<i>LOC387715/ARMS2</i>) Y LA RESPUESTA FUNCIONAL AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB	153
4.4.4.1.- Polimorfismo Y402H, características clínicas y respuesta a uno y dos años de seguimiento	154
4.4.4.2.- Polimorfismo A69S, características clínicas y respuesta a uno y dos años de seguimiento	159
4.4.4.3.- Influencia de los polimorfismos analizados sobre la respuesta a tres años de seguimiento	163
4.5.- EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB SOBRE LA MORFOLOGÍA MACULAR	174
4.5.1.- PARÁMETROS MORFOLÓGICOS EVALUADOS MEDIANTE SD-OCT	175
4.5.1.1.- Grosor retiniano central	175
4.5.1.2.- Alteraciones propias del complejo neovascular	178
4.5.1.3.- Línea de unión de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (IS/OS)	179
4.5.1.4.- Línea de la membrana limitante externa (MLE)	185
4.5.1.5.- Líquido subretiniano (LSR) y desprendimiento del epitelio pigmentario (DEP)	189
4.5.2.- VALOR DE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS MACULARES DETERMINADOS POR SD-OCT COMO FACTORES PRONÓSTICO DE LA FUNCIÓN VISUAL	190
4.5.3.- INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS Y402H Y A69S SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y SU RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB	192
4.5.3.1.- Polimorfismo Y402H	192
4.5.3.2.- Polimorfismo A69S	194
5.- DISCUSIÓN	197
5.1.- CALIDAD DE LAS MEDIDAS DEL ESPESOR RETINIANO CENTRAL REALIZADAS CON SPECTRALIS SD-OCT EN PACIENTES CON DMAE NEOVASCULAR	199
5.2.- CIRUGÍA DE CATARATAS MEDIANTE FACOEMULSIFICACIÓN COMO FACTOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE NEOVASCULARIZACIÓN COROIDEA	202

5.2.1.- LA FACOEMULSIFICACIÓN NO AUMENTA EL RIESGO DE NVC	202
5.2.2.- EFECTO DE LA FACOEMULSIFICACIÓN SOBRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS MACULARES	207
5.2.3.- RELEVANCIA DEL ESTUDIO PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA.....	208
5.3.- LOS POLIMORFISMOS Y402H (CFH) Y A69S (LOC387715/ARMS2) ESTÁN ASOCIADOS CON LA DMAE NEOVASCULAR EN PACIENTES DE LA COMUNIDAD DE MADRID	213
5.3.1.- COMPARACIÓN DE NUESTRO ESTUDIO CON OTROS REALIZADOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA.....	213
5.3.2.- POLIMORFISMOS Y402H Y A69S EN POBLACIÓN ESPAÑOLA, EUROPEA Y OTROS GRUPOS ÉTNICOS.....	216
5.3.3.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y RELEVANCIA PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA.....	218
5.4.- EFICACIA DE LA TERAPIA CON RANIBIZUMAB EN RÉGIMEN PRN E INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS Y402H Y A69S SOBRE LA RESPUESTA A UNO, DOS Y TRES AÑOS DE SEGUIMIENTO	221
5.4.1.- RESPUESTA FUNCIONAL	221
5.4.2.- NECESIDAD DE RETRATAMIENTOS	228
5.4.3.- POLIMORFISMOS Y402H Y A69S COMO FACTORES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB.....	229
5.5.- PARÁMETROS TOMOGRÁFICOS COMO FACTORES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA FUNCIONAL A LA TERAPIA CON RANIBIZUMAB	238
5.6.- INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS Y POSIBLE APLICACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA	247
6.- CONCLUSIONES	251
7.- BIBLIOGRAFÍA	257
ANEXOS.....	277
ANEXO I	279
ANEXO II	280
ANEXO III	281
ANEXO IV	285
ANEXO V	287
ANEXO VI.....	289

RESUMEN

RESUMEN

■ INTRODUCCIÓN

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la primera causa de ceguera en mayores de 65 años en los países occidentales. Consiste en un envejecimiento patológico del área de máximo rendimiento visual y comprende dos grandes modalidades: DMAE seca o atrófica y DMAE exudativa o neovascular. La DMAE seca es lentamente progresiva y se caracteriza por la atrofia del epitelio pigmentario retiniano y la degeneración gradual de los fotorreceptores, lo que conduce a un impedimento visual creciente. No existe aún tratamiento para esta patología. La DMAE neovascular, más rápidamente limitante, se origina como consecuencia del desarrollo de vasos anómalos procedentes de la coroides que infiltran el espacio sub o intrarretiniano. La permeabilidad de estos neovasos patológicos está alterada, lo que provoca liberación de fluido, que se acumula en la mácula, y aparición de hemorragias. La consecuencia es una afectación más brusca de la función visual. En la actualidad, el tratamiento de la DMAE neovascular consiste en la terapia con agentes antiangiogénicos que reducen las manifestaciones de la enfermedad y consiguen una mejora de la agudeza visual. El seguimiento de estos pacientes se ha beneficiado en los últimos años del desarrollo de los sistemas de tomografía de coherencia óptica (OCT) que complementan, de forma no invasiva, la información de los estudios angiográficos.

Entre los factores de riesgo para la DMAE neovascular, se encuentra la cirugía de cataratas, en particular cuando se realiza a pacientes que presentan DMAE incipiente. Sin embargo, no hay consenso generalizado acerca de los riesgos y beneficios de intervenir quirúrgicamente a estos pacientes. Resolver esta cuestión es importante en la práctica clínica ya que las cataratas y la DMAE se presentan a menudo de forma concurrente en personas ancianas dado que ambas patologías están asociadas a la edad.

Actualmente está claramente establecido que la genética tiene un papel crucial en el desarrollo de la DMAE y que la presencia de determinados polimorfismos aumenta el riesgo de padecer la enfermedad. En poblaciones caucásicas, se ha demostrado de forma consistente la asociación con la DMAE de dos polimorfismos: el Y402H (rs1061170, T/C) del gen *CFH* que codifica el factor H del complemento, y el A69S (rs10490924, G/T) del gen *LOC 387715/ARMS2* con función todavía desconocida. Sería interesante confirmar la asociación de estos dos polimorfismos en población española ya que hasta la fecha, los estudios realizados al respecto son muy escasos. Más recientemente, se ha comenzado a analizar la posible influencia de los factores genéticos sobre la respuesta de los pacientes con DMAE neovascular al tratamiento antiangiogénico. Aunque las inyecciones intravítreas con estos agentes (ranibizumab, bevacizumab) han revolucionado en los últimos años la terapia de la DMAE neovascular, no todos los pacientes responden satisfactoriamente y hoy día, no es posible

saber cuáles se beneficiarán del tratamiento, o mantendrán a largo plazo los resultados del mismo. Los estudios farmacogenéticos podrían permitir la identificación de polimorfismos relacionados con la respuesta individual de los pacientes a las terapias antiangiogénicas.

El conocimiento de otros factores, de fácil determinación en la práctica clínica, y con capacidad de predicción del resultado visual del tratamiento, también sería muy útil para orientar el tratamiento individualizado de los pacientes. La moderna tecnología de OCT de dominio espectral (SD-OCT), que por sus características superiores a la OCT de dominio temporal permite la visualización detallada de las estructuras retinianas, puede ayudar a la identificación de parámetros tomográficos con valor pronóstico de la función visual.

■ OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se diseñó con cuatro objetivos bien definidos:

1º. Determinar si la cirugía de cataratas mediante facoemulsificación es un factor predisponente para el desarrollo de DMAE neovascular.

2º. Analizar la asociación de los polimorfismos Y402H (rs1061170) del gen *CFH* y A69S (rs10490924) del gen *LOC387715/ARMS2* con la DMAE neovascular en población española de la Comunidad de Madrid.

3º. Determinar si el genotipo de los pacientes respecto a los polimorfismos Y402H y A69S se relaciona con las características clínicas de la patología en el momento del diagnóstico y/o con la respuesta a la terapia con ranibizumab (*Lucentis*®) administrado según el protocolo “a demanda.”

4º. Evaluar la utilidad de parámetros morfológicos maculares determinados mediante tomografía de coherencia óptica de dominio espectral como factores predictivos de la respuesta a ranibizumab (*Lucentis*®) para su posible aplicación en la práctica clínica.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñaron tres estudios diferentes.

Estudio I: Se trata de un estudio de cohortes prospectivo, unicéntrico, que incluía 93 pacientes con mácula normal y 79 pacientes con DMAE incipiente, que fueron intervenidos de catarata mediante cirugía de facoemulsificación. El seguimiento fue de doce meses, y tanto antes como después de la intervención, incluía evaluación tomográfica, más angiografía en los casos de sospecha de neovascularización.

Estudio II: Se trata de un estudio de casos-contróles compuesto por 117 pacientes de edad avanzada sin DMAE y 103 pacientes con DMAE neovascular. A partir de muestras de sangre periférica, se procedió a la extracción del ADN y al análisis genético de los polimorfismos Y402H y A69S.

Estudio III: Observación retrospectiva de 103 pacientes de nuestro Servicio diagnosticados de DMAE neovascular y en tratamiento exclusivo mediante ranibizumab intravítreo en régimen de tres inyecciones de carga más retratamientos a demanda. El seguimiento mínimo fue de doce meses y el máximo de 36 meses. En todos los pacientes se realizó angiografía y OCT de inicio, y OCT en cada visita, así como análisis genético para los polimorfismos mencionados. Con 47 pacientes de la muestra inicial se llevó a cabo el estudio de la morfología macular mediante SD-OCT y la respuesta al tratamiento con ranibizumab durante un año, determinándose diversos parámetros tomográficos.

■ RESULTADOS

Los resultados más relevantes obtenidos en los tres estudios se resumen a continuación.

Estudio I:

Ningún paciente desarrolló neovascularización coroidea a lo largo del seguimiento.
La SD-OCT se mostró más sensible que la funduscopia a la detección de cambios.
La agudeza visual mejoró dos o más líneas ETDRS en el 91,4% de los ojos.
La ganancia fue estadísticamente mayor en los pacientes sin DMAE asociada (12,3 letras ETDRS <i>versus</i> 6,2).

Estudio II:

Tabla 1.- Resultados de los estudios de asociación de los polimorfismos Y402H y A69S, con la DMAE exudativa en población española de la Comunidad de Madrid. Distribución alélica y genotípica en controles sanos y pacientes con DMAE neovascular.

SNP Y402H (Gen CFH)						
ALELO C	GENOTIPO TT		GENOTIPO TC		GENOTIPO CC	
Frecuencia Control DMAE	% Control DMAE	OR (Referencia)	% Control DMAE	OR (TC vs TT)	% Control DMAE	OR (CC vs TT)
0,308 0,519	47,0 21,4	1	44,4 53,4	2,64	8,5 25,2	6,5
SNP A69S (Gen LOC387715/ARMS2)						
ALELO T	GENOTIPO GG		GENOTIPO GT		GENOTIPO TT	
Frecuencia Control DMAE	% Control DMAE	OR (Referencia)	% Control DMAE	OR (GT vs GG)	% Control DMAE	OR (TT vs GG)
0,154 0,426	70,9 34,3	1	27,4 46,1	3,48	1,7 19,6	23,71

Se indican la frecuencia de los correspondientes alelos de riesgo, C o T, para los polimorfismos Y402H y A69S, respectivamente, y los porcentajes de los distintos genotipos en los controles y los pacientes con DMAE exudativa. OR: *odds ratio*.

Estudio III:

Tabla 2.- Respuesta funcional de pacientes con DMAE neovascular al tratamiento con ranibizumab intravítreo (0,5 mg/0,05 ml) consistente en dosis de carga y régimen *pro re nata* (PRN).

Nº pacientes Duración	Ganancia media Letras ETDRS			Ganan ≥ 15 letras % pacientes			Pierden < 15 letras % pacientes			Nº total de inyecciones	
	Carga	1 año	2 años	Carga	1 año	2 años	Carga	1 año	2 años	1 año	2 años
N = 103/ 90 1 y 2 años	8,1	7,7	6,7	27,2	29,1	23,3	98,0	96,1	94,4	5,3	8,9
N = 54 3 años	9,3	8,7	6,7 3 años: 4,1	29,6	29,6	20,4 3 años: 25,9	100	96,3	96,3 3 años: 90,7	4,8	8,1 3 años:14,2

- La terapia con ranibizumab fue eficaz en la práctica clínica real para mejorar la visión de los pacientes con DMAE neovascular. No obstante, la ganancia visual media conseguida tras la dosis de carga parece reducirse significativamente (44%) tras tres años de seguimiento. El número de inyecciones que reciben los pacientes durante el período de seguimiento no está relacionado con la agudeza visual al final del mismo.

- La presencia en homocigosis del alelo de riesgo para el polimorfismo A69S del gen *LOC 387715/ARMS2* se encontró asociada a un número significativamente mayor de retratamientos de ranibizumab al final del seguimiento a 36 meses. No se ha encontrado relación entre los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC 387715/ARMS2* con la respuesta funcional, ni con los cambios en la morfología macular inducidos por el tratamiento antiangiogénico, excepto en el estado de conservación de la línea IS/OS.

- La agudeza visual inicial es el más importante factor predictivo de la agudeza visual final, independientemente de la carga genética.

- Se ha hallado una correlación entre la agudeza visual final al año de seguimiento y los siguientes parámetros tomográficos: el grosor retiniano central al diagnóstico, y el estado de conservación en el momento del diagnóstico y al final de la fase de carga de las líneas que representan la unión de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (línea IS/OS), y la membrana limitante externa (línea MLE). El análisis de regresión lineal múltiple indica que la variable que contribuye a la agudeza visual final es el estado de conservación de la línea IS/OS tras la fase de carga.

■ CONCLUSIONES

1. La tomografía de coherencia óptica de dominio espectral resulta extremadamente útil en la evaluación de pacientes en riesgo de progresión en la DMAE. Las medidas realizadas con Spectralis muestran una excelente reproducibilidad.
2. La cirugía de cataratas mediante facoemulsificación no constituye un factor de riesgo para el desarrollo a corto-medio plazo de neovascularización coroidea y contribuye a mejorar la agudeza visual de los pacientes con DMAE incipiente.
3. La terapia con ranibizumab en régimen PRN es eficaz para mejorar la visión de los pacientes con DMAE neovascular a lo largo de tres años de seguimiento. Uno de cada cuatro pacientes consigue una ganancia de quince o más letras ETDRS, umbral que supone una importante mejora de la calidad de vida.
4. El número de inyecciones que reciben los pacientes durante el período de seguimiento no está relacionado con la agudeza visual al final del mismo.
5. Los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* están estrechamente asociados con la DMAE neovascular en pacientes españoles de la Comunidad de Madrid. Una copia del alelo de riesgo C (polimorfismo Y402H) duplica la posibilidad de padecer la patología. Dos copias la multiplican por seis. La asociación es más fuerte para el polimorfismo A69S, ya que el alelo T en heterocigosis u homocigosis aumenta este riesgo tres y veintitrés veces, respectivamente.
6. La presencia en homocigosis del alelo de riesgo del polimorfismo A69S se asocia a un mayor número de tratamientos a largo plazo con ranibizumab intravítreo.
7. No se ha encontrado relación entre los polimorfismos Y402H y A69S con la respuesta funcional.
8. La agudeza visual inicial es el más importante factor predictivo de la agudeza visual final, independientemente de la carga genética.
9. El espesor retiniano central inicial y el estado de conservación de las líneas IS/OS y MLE basal y tras dosis de carga, determinados por tomografía de coherencia óptica de dominio espectral se correlacionan con la agudeza visual final al año.
10. El genotipo de riesgo para el polimorfismo Y402H se relaciona con una evolución desfavorable del estado de conservación de la línea IS/OS tras doce meses de tratamiento con ranibizumab.

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AFG:	Angiografía fluoresceínica
APS:	Persulfato amónico
AV:	Agudeza visual
AVI:	Angiografía con verde de indocianina
CCI:	Coefficiente de correlación intraclase
CFH:	Factor H del complemento
CRT:	Grosor/espesor retiniano central
DEP:	Desprendimiento del epitelio pigmentario retiniano
DE:	Desviación estándar
DMAE:	Degeneración macular asociada a la edad
EPR:	Epitelio pigmentario de la retina
ETDRS:	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
GAG:	Glicosaminoglicanos
IS/OS:	Unión de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores
LSR:	Líquido subretiniano
MAC:	Complejo de ataque a la membrana (<i>membrane attack complex</i>)
MAE:	Maculopatía asociada a la edad
MAM:	Máxima altura macular
MAVC:	Mejor agudeza visual corregida
MLE:	Membrana limitante externa
NVC:	Neovascularización coroidea
OCT:	Optic coherence tomography (Tomografía de coherencia óptica)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEDF:	Factor derivado del epitelio pigmentario
RAP:	Proliferación angiomasosa retiniana
SD-OCT:	OCT de dominio espectral
SNP:	Polimorfismos de nucleótido único
TAE:	Tris-acetato EDTA
TBE:	Tris-Borato-EDTA
TIMP:	Inhibidores tisulares de metaloproteasas de matriz
TPD:	Terapia fotodinámica
VCP:	Vasculopatía coroidea polipoidea
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ZAF:	Zona avascular foveal

ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

En esta Tesis se distinguen siete partes: Introducción; Objetivos; Sujetos, Material y Métodos; Resultados; Discusión; Conclusiones; y Bibliografía.

La introducción comienza con la definición y epidemiología de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), y la revisión pormenorizada de las estructuras oculares implicadas en la enfermedad y sus alteraciones en la situación patológica. En el siguiente gran apartado se describen los tipos de DMAE, sus características clínicas y sintomatología, así como las técnicas de diagnóstico disponibles en la actualidad. En el cuarto bloque se analizan los factores de riesgo para el desarrollo de la DMAE, prestando especial interés a la cirugía de cataratas, a la cual se dedica el apartado quinto. En la sección sexta, se estudia la influencia de los factores genéticos sobre el desarrollo de la DMAE, en particular de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2* cuya relación con la patogénesis de la enfermedad se discute a la luz de los conocimientos actuales. En el bloque sexto de la introducción se repasan de forma minuciosa las diferentes posibilidades terapéuticas para el tratamiento de la DMAE, incluyendo aquellas opciones actualmente en fase preclínica, que parecen arrojar resultados prometedores. Por su importancia, se ha dedicado el apartado séptimo al estudio detallado de los agentes antiangiogénicos, en particular ranibizumab, analizándose los resultados de los diferentes regímenes de administración empleados en la práctica clínica, en términos de eficacia y seguridad. Finalmente, en la última sección de la introducción se plantea la posibilidad de que los factores genéticos pudieran influir en la respuesta terapéutica como un interrogante a resolver.

En la segunda parte de esta Memoria se exponen de forma breve y concreta los objetivos del trabajo de la Tesis Doctoral, que se pueden resumir en: *i)* evaluar si la cirugía de cataratas aumenta el riesgo de progresión a DMAE avanzada en pacientes con DMAE incipiente, y *ii)* analizar si los genotipos para los polimorfismos Y402H y A69S de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2*, así como diversos parámetros morfológicos determinados mediante OCT, influyen sobre la respuesta a la terapia con ranibizumab (*Lucentis*[®]) evaluando su utilidad como posibles factores predictivos.

La tercera parte corresponde a la descripción de los sujetos, material y métodos utilizados para la realización de esta investigación. La Tesis contiene tres estudios, todos ellos unicéntricos y de evaluación clínica. En uno de ellos, de carácter retrospectivo, se ha analizado además el genotipo de los sujetos que componían la muestra. Las características de los estudios y los aspectos éticos, así como los criterios de inclusión y exclusión de cada uno de ellos, son expuestos con detalle. Posteriormente, en los apartados segundo y tercero, se explican de forma minuciosa cada una de las exploraciones clínicas realizadas a los pacientes

y los tratamientos que se llevaron a cabo. En el cuarto apartado se detallan paso a paso las etapas seguidas para analizar el genotipo de 117 sujetos control y 103 pacientes con DMAE neovascular. Por último, en la sección quinta, se mencionan las técnicas estadísticas empleadas en el análisis de los distintos resultados.

En la cuarta parte de la Memoria se exponen los resultados de los tres estudios incluidos en la Tesis, con una descripción analítica de los mismos, acompañada de tablas, imágenes y figuras que ilustran y documentan las observaciones realizadas.

La quinta parte corresponde a la discusión, y en ella se revisan de forma crítica los resultados obtenidos en cada uno de los tres estudios incluidos en la Tesis Doctoral. La discusión está formada por cinco bloques ya que la complejidad del estudio tercero hace aconsejable su división en dos apartados. En el primero de ellos, se trata la respuesta funcional al tratamiento con ranibizumab y su relación con los marcadores genéticos seleccionados, y el segundo versa sobre la respuesta anatómica y su relación con dichos marcadores. En cada uno de los cinco bloques, se analizan los resultados de nuestras investigaciones abordando los posibles puntos fuertes y débiles, se discute el significado fisiológico, y se valora la repercusión de dichos resultados en el manejo de los pacientes con DMAE neovascular en la práctica clínica.

En la sexta parte se enumeran las principales conclusiones del trabajo.

En la séptima y última parte, bibliografía, se incluyen las referencias de los trabajos científicos consultados para la realización de esta tesis.

Finalmente se incluyen como Anexos los documentos correspondientes a la aprobación de los protocolos de los estudios por el Comité de Ética e Investigación Clínica de Hospital Clínico San Carlos de Madrid, los modelos de consentimiento informado y las fichas de recogida de datos.

HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO

HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO

El estudio **E1** incluido en esta Tesis Doctoral es el primer estudio clínico prospectivo en el que se ha utilizado de forma sistemática la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (Spectralis-HRA) para el diagnóstico y seguimiento de pacientes sometidos a cirugía de cataratas. Se demuestra que la OCT es una técnica idónea para realizar una evaluación preoperatoria adecuada ya que presenta ventajas sobre las técnicas diagnósticas empleadas convencionalmente, por lo que se propone su empleo sistemático en los pacientes con DMAE incipiente con carácter previo a la intervención quirúrgica.

El estudio **E2**, es asimismo, el primero que estudia la asociación de los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* con la DMAE neovascular en población española de la Comunidad de Madrid. Ambos polimorfismos aumentan el riesgo para desarrollar la patología, siendo llamativo que el polimorfismo A69S muestra una asociación mucho más estrecha en esta muestra que la hallada en tres estudios realizados anteriormente con población española de otras localizaciones geográficas.

El estudio **E3** ha permitido identificar factores predictivos de la respuesta de los pacientes con DMAE neovascular al tratamiento con ranibizumab (*Lucentis*®). La variante 69S del gen *LOC387715/ARMS2* en homocigosis se asocia con la necesidad de más retratamientos a largo plazo tras la fase de carga. Por otra parte, mediante el empleo de la OCT de dominio espectral se han analizado los efectos de un tratamiento con ranibizumab durante doce meses sobre la morfología macular. Después de identificar los parámetros tomográficos relacionados con la agudeza visual final, se ha determinado que la integridad de la línea correspondiente a la unión de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (línea IS/OS) tras la fase de carga es un factor pronóstico de buena función visual al final del período de seguimiento. El genotipo de riesgo para el polimorfismo Y402H se relaciona con una evolución desfavorable del estado de conservación de la línea IS/OS tras doce meses de tratamiento con ranibizumab.

En su conjunto, esta Tesis Doctoral aporta resultados relevantes que previsiblemente serán útiles para el manejo en la práctica clínica de los pacientes afectados por DMAE neovascular.

**PUBLICACIONES Y
COMUNICACIONES A CONGRESOS**

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

■ 1. PUBLICACIONES

- 1.1. Valverde-Megías A, Donate-López J.** La influencia de la genética en la degeneración macular asociada a la edad y su respuesta al tratamiento. Revista: Patología Macular 2010; 5:14-18. ISSN: 1889-6626.
- 1.2. Donate J, Valverde A, Morales L, Ruiz A.** Novedades en enfermedad macular. En busca del resultado. Revista: Ophthalmology Conference Reports. Annual Meeting of the American Academy of Ophthalmology. 2010; 1: 13-15.

■ 2. COMUNICACIONES A CONGRESOS

- 2.1. Valverde-Megías A, Donate-López J, Reche-Frutos J, García-Feijoo J.** Evaluación de la línea IS/OS en NVC secundaria a DMAE mediante OCT Spectralis. Dos años de tratamiento con Ranibizumab. 88 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. (Comunicación oral CI 13). Barcelona, 2012.
- 2.1. Valverde-Megías A, Donate-López J, Reche-Frutos J, Calvo-González C, García-Feijoo J.** *CFH* and *LOC387715/AMRS2* polymorphisms in exudative ARMD response to ranibizumab. 12th Congress of the European Society of Retina Specialists. (Comunicación oral). Milán, 2012.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Las cataratas son la patología ocular más frecuente en la población anciana. La cirugía consistente en la extracción del cristalino y la implantación de lentes intraoculares es un procedimiento efectivo y seguro, y la intervención quirúrgica más frecuentemente practicada en todo el mundo. Puesto que la degeneración macular se asocia a la edad, la comorbilidad de la DMAE y las cataratas en la población anciana es alta. Existe una controversia acerca de si la cirugía de cataratas constituye un factor de riesgo para el desarrollo de DMAE neovascular, particularmente en pacientes con DMAE incipiente, y los resultados de diversos estudios epidemiológicos y clínicos al respecto son contradictorios. Hay que señalar que en los estudios clínicos publicados hasta la fecha no se ha utilizado la tomografía de coherencia óptica (OCT) de dominio espectral para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes sometidos a esta intervención. Puesto que la presencia de cataratas puede dificultar la detección de una DMAE concurrente mediante las técnicas convencionales, cabe la posibilidad de que se hayan sobreestimado los casos en los que se desarrolla DMAE neovascular tras la cirugía a causa de una inadecuada valoración del estado preoperatorio.

Resolver esta cuestión es importante ya que el envejecimiento progresivo de la población supone que el número de personas potencialmente afectadas por ambas patologías oculares es elevado y aumentará en los próximos años. A partir de los datos del INE y los resultados de estudios epidemiológicos, se estima que más de un millón de personas de 65 o más años en España tiene en la actualidad algún grado de DMAE o alto riesgo de padecer la patología. Las previsiones del INE indican que en cuarenta años la población mayor de 65 años se duplicará, pasando a representar el 30% de la población total española, por lo que es esencial establecer si la cirugía de cataratas es o no un factor precipitante de la neovascularización coroidea. Si la intervención condujera realmente a la progresión de la DMAE incipiente, debería considerarse la procedencia de la cirugía en estos pacientes y/o extremarse las precauciones en el seguimiento de los mismos.

Otro aspecto que está recibiendo gran atención en la actualidad se refiere a la identificación de factores predictivos de la respuesta de los pacientes con DMAE neovascular al tratamiento con antiangiogénicos. Hasta el momento, ranibizumab intravítreo (*Lucentis*®) se ha mostrado como una opción terapéutica eficaz para evitar la pérdida visual severa en un número de casos y mejorar la visión en algunos pacientes. Sin embargo, la respuesta individual al agente antiangiogénico es muy variable y en ocasiones, no se consigue una respuesta satisfactoria al tratamiento. Por tanto, es importante identificar factores asociados con empeoramiento, estabilización o mejoría de la visión que permitan predecir qué pacientes tendrán posibilidades de beneficiarse de la terapia antiangiogénica. Así, se eliminarían los riesgos asociados tanto al fármaco como a la vía de administración en el caso

de pacientes no respondedores, y se podría optimizar el coste económico derivado del tratamiento de una población numerosa y en continuo aumento.

Se ha establecido que ciertos marcadores genéticos están asociados a un aumento del riesgo para el desarrollo de DMAE avanzada. En concreto, los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) rs1061170 del gen *CFH* (Tyr402His) y rs10490924 del gen *LOC387715/ARMS2* (Ala69Ser) se han identificado en diferentes poblaciones europeas como los principales factores genéticos de riesgo para el desarrollo de DMAE neovascular. Sin embargo, los estudios sobre la farmacogenética de la DMAE se han iniciado recientemente y los escasos datos disponibles son discrepantes, por lo que no se conoce si estos polimorfismos también pueden influenciar a largo plazo la respuesta al tratamiento con ranibizumab. Hay que considerar que los eventos que conducen al desarrollo de neovascularización coroidea en el curso de la DMAE no son bien conocidos y tampoco se sabe si dichos eventos pueden o no estar relacionados con la respuesta al tratamiento con el agente antiangiogénico. Por tanto, los marcadores genéticos potencialmente asociados a la respuesta a la terapia podrían o no ser coincidentes con los que confieren susceptibilidad para padecer la enfermedad.

También sería muy interesante evaluar la utilidad de parámetros morfológicos maculares, determinados mediante OCT, como factores predictivos de la respuesta a la terapia con ranibizumab. Con la OCT de dominio espectral es posible la visualización detallada de las estructuras retinianas, de forma que se puede obtener información acerca de su estado en el momento del diagnóstico de la DMAE exudativa y a lo largo del tratamiento, que podría relacionarse con la respuesta funcional. En el momento del diagnóstico de la enfermedad, cabe la posibilidad de que como consecuencia de la neovascularización, se encuentren dañados de forma irreversible los fotorreceptores, en cuyo caso, la terapia antiangiogénica resultaría ineficaz. Por otra parte, en los regímenes de tratamiento flexibles, en los que el fármaco no se inyecta según una pauta fija mensual, se considera que la pérdida de agudeza visual de más de cinco letras ETDRS o el aumento del grosor central retiniano son criterios básicos que definen la necesidad de retratamiento. Sin embargo, estos criterios presentan limitaciones. La pérdida de función visual es previsiblemente la consecuencia de cambios morfológicos previos, reversibles o irreversibles, de forma que el retratamiento será eficaz o no en función de la naturaleza de las alteraciones morfológicas subyacentes. En cuanto al segundo criterio, ha adquirido una importancia creciente en los últimos años, pero la supresión de la actividad de la lesión tras la inyección de ranibizumab, y la consiguiente disminución del espesor retiniano central, no se asocian necesariamente a mejoría visual.

Todo lo anterior indica la necesidad de identificar factores predictivos de la respuesta visual al tratamiento con ranibizumab que permitan orientar el manejo de los pacientes afectados por DMAE neovascular en la práctica clínica.

Las hipótesis de la presente Tesis Doctoral son:

- 1º.** Una inadecuada valoración del estado preoperatorio de los pacientes remitidos para cirugía de cataratas puede conducir a la sobreestimación de los casos de desarrollo de DMAE neovascular o de progresión de la DMAE incipiente a formas avanzadas de la enfermedad como consecuencia de la intervención quirúrgica. La OCT de dominio espectral puede permitir la correcta valoración del estado inicial de los pacientes, el diagnóstico precoz y tratamiento de la DMAE exudativa concurrente con las cataratas, y la eliminación de falsos positivos tras la intervención quirúrgica.
- 2º.** Los genotipos para los polimorfismos Tyr402His del gen *CFH* y Ala69Ser del gen *LOC387715/ARMS2* pueden influenciar la respuesta funcional de los pacientes con DMAE neovascular al tratamiento con ranibizumab, el número de retratamientos requeridos a lo largo del seguimiento, y/o los cambios de la anatomía retiniana inducidos por la terapia antiangiogénica. En tal caso, estos polimorfismos podrían constituir marcadores genéticos con valor predictivo de la respuesta a terapia antiangiogénica.
- 3º.** El análisis de la línea de unión entre los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (línea IS/OS) y de la membrana limitante externa en las tomografías obtenidas con la OCT de dominio espectral puede proporcionar información sobre el estado de los fotorreceptores que será de utilidad para predecir la respuesta funcional de los pacientes con DMAE neovascular al tratamiento con ranibizumab.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (DMAE)

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es un trastorno ocular frecuente que ocasiona un 50% de los casos de ceguera legal en los países industrializados y se reconoce hoy día como una de las principales causas de ceguera en todo el mundo. La prevalencia de la DMAE en los mayores de 65 años oscila entre el 3.3% y el 9.8% según diversos estudios realizados en poblaciones occidentales, siendo infrecuente a edades inferiores a 55 años¹⁻⁵. En España, un reciente estudio⁶ llevado a cabo con 2132 personas mayores de 65 años de distinta procedencia geográfica ha estimado que la prevalencia de la DMAE es del 3.4% y un porcentaje del 10.3% presentaba maculopatía. En el grupo de mayores de 80 años, la prevalencia de la DMAE se elevó al 8.5%. Dado que la proporción de ancianos aumenta continuamente, se estima que en el año 2020 estarán afectadas por DMAE al menos 80 millones de personas en el mundo.

En contraste con la alta prevalencia actual de la enfermedad, en el siglo XIX se consideraba un raro desorden descrito como *un trastorno coriorretinal en personas seniles*⁷. Este incremento en la prevalencia de la DMAE no puede explicarse sólo por el aumento en la esperanza de vida sino que, como se expone en esta Memoria, en su desarrollo intervienen factores genéticos y ambientales.

La DMAE se caracteriza por la aparición de alteraciones degenerativas en la mácula, una zona circular de 5-6 mm de diámetro localizada en la parte posterior del globo ocular, en el centro de la retina, que permite al ojo percibir los detalles (Figura 1.1). Esta región, especialmente su área central, la fovea, presenta características estructurales distintas del resto de la retina que le confieren una alta agudeza visual en comparación con la retina periférica y, probablemente, también se relacionan con su mayor susceptibilidad a padecer procesos degenerativos:

- 1.- La mácula posee la densidad más alta de fotorreceptores de toda la retina y su composición es peculiar. Así, mientras que en la retina periférica predominan los bastones sobre los conos en proporción 20:1, en gran parte de la mácula la relación es 9:1, y en la

fóvea se encuentran básicamente conos (~ 120.000 por mm^2)⁸. Estas células fotorreceptoras median la visión diurna y son críticas para la discriminación del color y la agudeza visual.

- 2.- En la fóvea, cada cono está conectado a una única célula bipolar que, a su vez, contacta sólo con una célula ganglionar, a diferencia de otras áreas de la retina en las que cada una de las células bipolares y ganglionares sirve a múltiples fotorreceptores⁹. Esta relación 1:1 de conos a células bipolares y ganglionares permite maximizar la agudeza visual.
- 3.- Por otra parte, en la fóvea, los cuerpos celulares de las neuronas proximales de la retina están desplazados lateralmente, lo que permite que la luz incidente penetre en los fotorreceptores con la mínima distorsión^{10,11}.

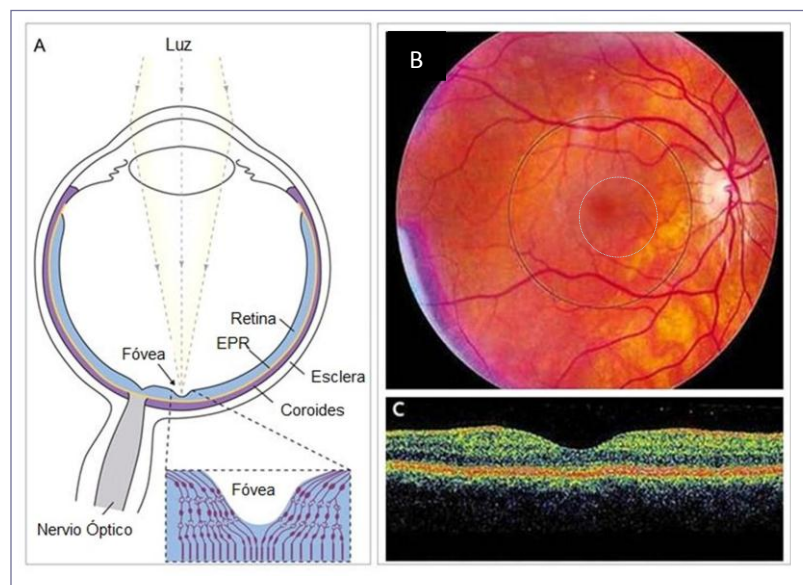


Figura 1.1.- El órgano visual. (A) Representación esquemática del ojo. El recuadro muestra un diagrama ampliado de la fóvea. (B) Fondo de ojo y retina normales. El área dentro del círculo externo es la mácula y la región delimitada por el círculo interno es la fóvea. (C) Imagen transversal de la retina generada por tomografía de coherencia óptica, una técnica que permite la visualización no invasiva de la arquitectura retiniana en tiempo real. La depresión corresponde a la fóvea.

Debido a estas características singulares, la zona macular enriquecida en conos es la región de la retina responsable de la agudeza visual de alta resolución. En consecuencia las alteraciones degenerativas que ocurren en la DMAE ocasionan una pérdida de visión que afecta al campo visual central.

1.2.- ESTRUCTURAS OCULARES IMPLICADAS EN LA DMAE

Las estructuras oculares involucradas en la DMAE son los fotorreceptores, el epitelio pigmentario retiniano (EPR), la membrana de Bruch y la coriocapilar (Figura 1.2). Estas estructuras son metabólicamente interdependientes, por lo que la alteración de cualquiera de ellas afectará previsiblemente a las restantes.

1.2.1.- FOTORRECEPTORES

Los **fotorreceptores**, son neuronas especializadas que se localizan en la retina externa, la región más alejada de la luz incidente. La luz debe atravesar las capas internas transparentes de la retina antes de que puedan ser capturadas por el fotorreceptor. Aunque intuitivamente esta organización puede parecer inadecuada, permite que las células del EPR, que se yuxtaponen al extremo apical de los fotorreceptores, absorban la luz dispersada o la no capturada por el fotorreceptor. Los dos tipos de fotorreceptores, conos y bastones, se diferencian en su estructura, tipo de fotopigmento, patrón de conexión sináptica y distribución en la retina⁹. Estas propiedades reflejan el hecho de que ambos sistemas están especializados en diferentes aspectos de la visión: el sistema de bastones tiene resolución espacial baja pero es extremadamente sensible a la luz (visión escotópica, nocturna), mientras que el sistema de conos, con alta resolución espacial pero relativamente insensible a la luz (visión fotópica, diurna), es responsable de la agudeza visual.

Los segmentos internos de los fotorreceptores son muy ricos en mitocondrias, las cuales suministran la energía necesaria a estas células con una alta actividad metabólica. De hecho, los fotorreceptores consumen más oxígeno por gramo de tejido que cualquier otra célula del cuerpo¹⁰. Los segmentos externos se componen de un apilamiento de membranas dispuestas a modo de discos que contienen los pigmentos que absorben los fotones e inician el proceso visual mediante su conversión en un potencial de acción. Mediante las sinapsis, la información es transmitida, vía células bipolares, a las células ganglionares. Esta información también resulta modificada por las interacciones laterales que se establecen con las células amacrinas interneuronales y las células horizontales. La retina humana posee ~130 millones de fotorreceptores, ~5 millones de células bipolares y ~1 millón de células ganglionares¹¹.

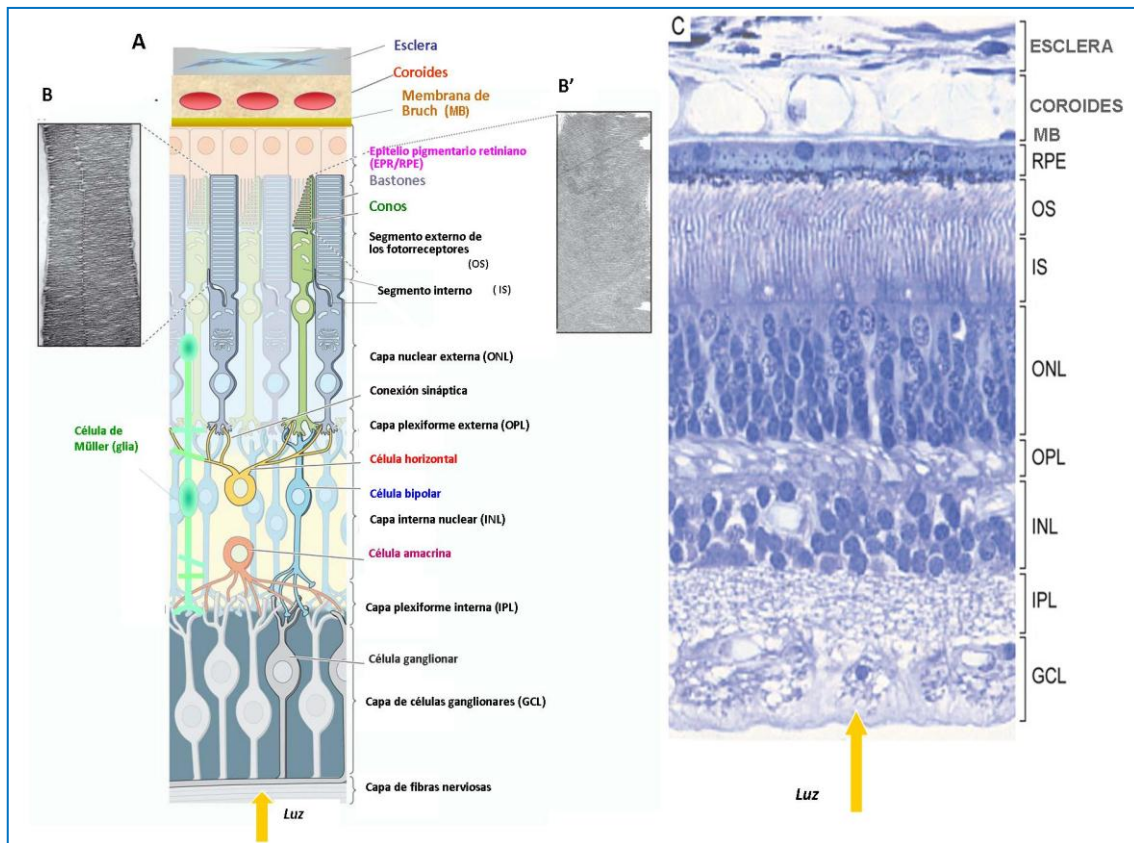


Figura 1.2.- Anatomía coriorretiniana y estructuras oculares involucradas en la DMAE. (A) Esquema que representa una sección transversal de la retina neural y externa a ella, el EPR, la membrana de Bruch y la coroides. (B y B') Micrografías electrónicas de los segmentos externos de los bastones y los conos, respectivamente, en las que se aprecian los discos de membranas apilados. (C) Tinción con eosina-hematoxilina que muestra las diferentes capas de la retina, y la membrana de Bruch interpuesta entre el EPR y la coroides.

Mediante estudios histológicos, y más recientemente estudios clínicos que emplean la tomografía de coherencia óptica (OCT), se ha demostrado que en la DMAE ocurre degeneración y pérdida progresiva de fotorreceptores en la mácula probablemente como consecuencia de la disfunción del EPR y/o la formación de tejido cicatricial^{10, 12-16}.

1.2.2.- EPITELIO PIGMENTARIO RETINIANO

El **epitelio pigmentario retiniano (EPR)** es una monocapa de células epiteliales pigmentadas polarizadas que desempeña funciones especializadas esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de los fotorreceptores tales como

fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores dañados por la fotooxidación, producción de la matriz de mucopolisacáridos que rodea los segmentos externos, almacenamiento y metabolismo de la vitamina A, y transporte activo de nutrientes hacia los fotorreceptores y de sustancias de desecho hacia los capilares coroideos a través de la membrana de Bruch (Figura 1.3). También juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la barrera hemato-ocular externa y en la formación de la lámina basal. Además, el EPR posee una intensa actividad secretora y libera una amplia variedad de factores que son esenciales para la conservación de la integridad estructural de la retina y la coriocapilar. Entre las moléculas secretadas se encuentran factores neurotróficos, interleuquinas, inhibidores tisulares de metaloproteasas de matriz (TIMP), factores de crecimiento diversos y factores vasoactivos, entre los cuales son especialmente relevantes en la patogénesis de la DMAE el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), con propiedades angiogénicas y antiangiogénicas, respectivamente^{10, 17}. En el ojo adulto, el EPR es mitóticamente inactivo, aunque si sufre daño mecánico o inducido por la luz, sus células pueden proliferar de forma similar a la de otros tejidos epiteliales¹⁸.

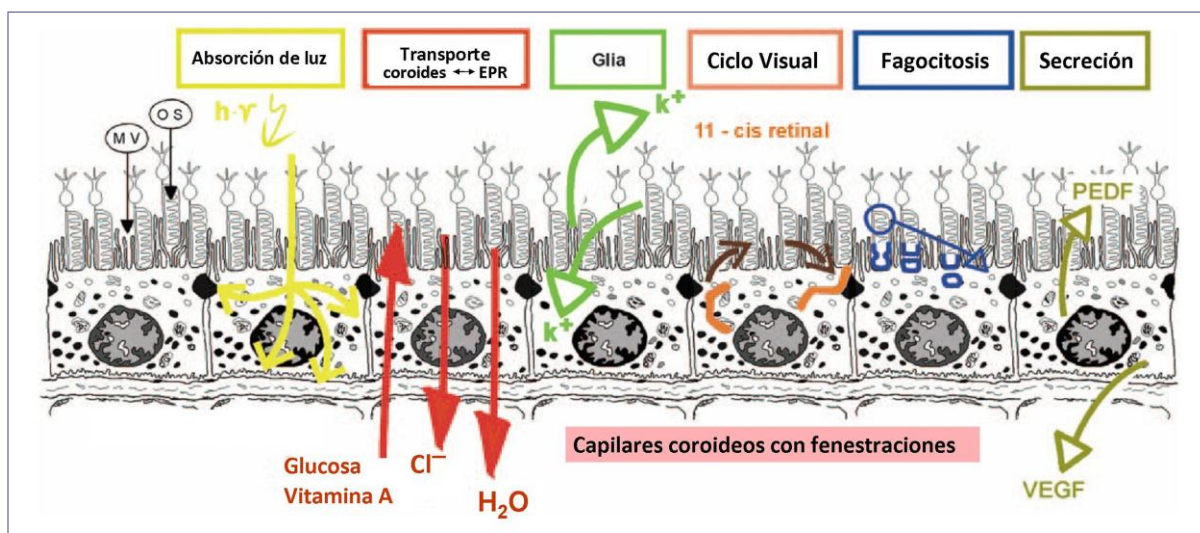


Figura 1.3.- Funciones del epitelio pigmentario retiniano. MV, microvellosidades; OS, segmentos externos de los fotorreceptores; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; PEDF, factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario.

El proceso de fagocitosis y reciclaje de la porción distal de los segmentos externos de los fotorreceptores, necesario para preservar la función visual, es muy activo y requiere grandes cantidades de energía. De hecho, el EPR recicla aproximadamente 30.000 segmentos externos cada día y se ha estimado que una sola célula del EPR ingiere y degrada trescientos millones de discos a lo largo de los 70 años de vida media de un individuo^{19, 10}. Tras la fusión de los fagosomas con lisosomas, el material fagocitado es degradado por las enzimas lisosomales a sus componentes individuales. Una parte de estos productos es reciclada hacia los fotorreceptores para la regeneración de los segmentos externos y el resto se transfiere a la membrana de Bruch para su eliminación a través de los capilares coroideos. El material no degradado forma los denominados cuerpos residuales.

Se ha observado que la actividad lisosomal de las células del EPR es más intensa en la mácula que en la retina periférica a causa del predominio de conos, los fotorreceptores con mayor consumo energético. Por ello, el EPR macular soporta una mayor velocidad del proceso de fagocitosis de segmentos externos²⁰. Con la edad y en la DMAE, disminuye la eficiencia del procesamiento lisosomal, lo que provoca una acumulación de cuerpos residuales en las células del EPR que será más acusada en el EPR macular dada su alta actividad fagocítica²¹. Ésta puede ser una de las razones que expliquen, al menos en parte, por qué la degeneración del EPR ocurre preferentemente en la mácula.

Los ojos con DMAE temprana muestran, a nivel histológico, disminución en el número y la densidad de las células del EPR en la retina central (en la mácula por ejemplo), lo que se describe como moteado del EPR. Los cambios que pueden afectar a estas células incluyen pleomorfismo, despigmentación, hiperpigmentación, hipertrofia, hiperplasia y atrofia. Con el microscopio óptico pueden detectarse focos de depósito pigmentario subretinianos o de migración pigmentaria intrarretiniana en la capa nuclear externa, y áreas localizadas de hipertrofia del EPR, que se corresponden clínicamente con hiperpigmentación o agregación focal del EPR²².

Las alteraciones del EPR pueden contribuir a la génesis de la DMAE a través de múltiples mecanismos. Un importante componente de los cuerpos residuales, que está formado por combinaciones de trans-retinal y etanolamina o fosfatidiletanolamina, es muy

resistente a la degradación y se convierte en el pigmento autofluorescente lipofuscina en el medio ácido del fagolisosoma. La lipofuscina es un generador de radicales libres, de forma que al acumularse los gránulos del fluoróforo se producirán mayores niveles de radicales libres y, eventualmente, daño oxidativo a las células del EPR¹⁵. Además, se ha demostrado que los productos de fotodegradación de la lipofuscina, y el malondialdehído originado por la peroxidación lipídica, son activadores de la ruta alternativa del complemento^{23, 24}. Estos estímulos inductores, unidos a una regulación defectuosa del complemento, contribuirían a la inflamación crónica que subyace a la patogénesis de la DMAE.

Por otra parte, la incapacidad del EPR para degradar los materiales del fagosoma da lugar a un reciclaje deficiente de los lípidos requeridos para la regeneración de los segmentos externos de los fotorreceptores. También se ha propuesto que la acumulación de cuerpos residuales puede perturbar profundamente el metabolismo de las células del EPR y favorecer la peroxidación lipídica conduciendo a la apoptosis celular y a la liberación de lípidos oxidados y partículas apoptóticas a la membrana de Bruch¹⁹. Estos residuos modifican las propiedades de dicha membrana y podrían constituir el núcleo para la formación de los depósitos basales y las drusas presentes en la DMAE.

1.2.3.- MEMBRANA DE BRUCH

La **membrana de Bruch** es una delgada capa (2-4 micras) de tejido conectivo situada entre el EPR y la coriocalpilar, el denso lecho capilar adyacente de la coroides (Figura 1.1). Esta matriz acelular tiene una estructura pentalaminar formada por la membrana basal del EPR, la capa colágena interna, la capa elástica central, la capa colágena externa y la membrana basal de la coriocalpilar. La membrana basal del EPR es una capa continua que contiene colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, y proteoglicanos con heparán sulfato y condroitín/dermatán sulfato. La capa interna colágena está formada por fibras de colágeno tipo I, III y V embebidas en una masa de moléculas que interaccionan entre sí, tales como glicosaminoglicanos (heparán sulfato y condroitín/dermatán sulfato) y componentes de los sistemas de coagulación y del complemento. La capa elástica contiene, además de fibras de elastina apiladas en capas, colágeno tipo VI, fibronectina y otras sustancias asociadas a las proteínas. La capa externa colágena es más delgada que la interna (0.7 vs 1.4 μm) pero presenta los

mismos componentes. Finalmente, la membrana basal de la coriocapilar es una capa discontinua debido a la presencia de las llamadas columnas intercapilares de la coroides; sus principales integrantes son laminina, heparán sulfato y colágenos tipo IV, V y VI. Dado que la membrana de Bruch es acelular, la producción de sus constituyentes depende del EPR adyacente y de las células coroides. El recambio de sus componentes es llevado a cabo por metaloproteasas de matriz¹⁸.

La membrana de Bruch proporciona un soporte al cual se adhiere el EPR, y actúa como un filtro semi-permeable que regula el intercambio de biomoléculas, nutrientes, oxígeno, fluidos y productos de desecho entre el EPR y la coriocapilar. Además, esta matriz extracelular estratificada funciona como una barrera física que limita la migración celular, especialmente la invasión de tejido neovascular desde la coroides hacia el espacio subretiniano. Es interesante mencionar que la membrana de Bruch es estructuralmente diferente en el área macular y el resto de la retina: la capa de elastina es 3-6 veces más delgada y 2-5 veces más porosa en la mácula que en la retina periférica²⁵. Estas diferencias topográficas no se deben a una menor expresión del gen de la elastina²⁶ y probablemente se relacionan con la necesidad de un eficaz y activo intercambio impuesto por las altas demandas metabólicas del complejo EPR-fotorreceptores en esta región.

Con la edad, se produce un engrosamiento de la membrana de Bruch que dificulta el intercambio metabólico. Este fenómeno se debe a la formación de unos depósitos heterogéneos llamados depósitos basales. Los depósitos localizados entre el EPR y su membrana basal se conocen como *depósitos laminares basales* (Figura 1.4). Cuando se asocian al proceso fisiológico de envejecimiento, son estrechos, discontinuos y de composición homogénea predominando moléculas normales de la membrana basal del EPR como colágeno tipo IV y VI, laminina y proteoglicanos con heparán sulfato que, probablemente, se acumulan por un exceso de producción o un descenso en su degradación. Sin embargo, en la DMAE estos depósitos aumentan su espesor, formando una capa continua de hasta 15 μm , y acumulan desechos heterogéneos, lipoproteínas y proteínas inflamatorias. A su vez, los depósitos que se forman en la capa colágena interna de la membrana de Bruch, compuestos inicialmente por gránulos lipídicos, se conocen como *depósitos lineares basales*; cuando se

acumulan suficientes residuos dan lugar a depósitos focales, que protruyen hacia EPR y se denominan **drusas**^{18, 27}.

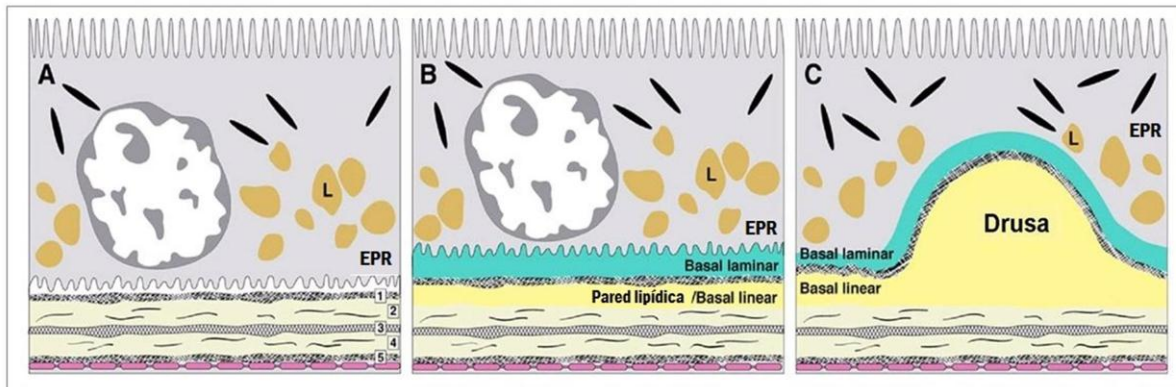


Figura 1.4.- Membrana de Bruch y lesiones extracelulares asociadas con la DMAE. (A) Capas de la membrana de Bruch en el ojo normal: 1, membrana basal del EPR; 2, capa colágena interna; 3, capa elástica; 4, capa colágena externa; 5, membrana basal de la coriocalicular. L, lipofuscina. (B) En la DMAE se acumulan dos tipos de depósitos: laminares, entre el EPR y su membrana basal, y lineares, en la capa colágena interna. (C) Formación de una drusa. Obsérvese que la drusa y el depósito basal lineal ocupan el mismo plano.

Las drusas contienen lípidos neutros (colesterol y ésteres de colesterol), fosfolípidos, apolipoproteínas (apo-E y apo-B), y al menos 129 proteínas incluyendo proteínas de fase aguda (por ejemplo, proteína C reactiva, α_1 -antitripsina y fibrinógeno), inhibidor tisular 3 de las metaloproteasas de matriz, cristalina, albúmina sérica y numerosos componentes, activadores e inhibidores de la vía del complemento (por ejemplo, factor H, C3, C5, el complejo de ataque a la membrana C5b-9, vitronectina, clusterina, β -amiloides y el componente de la lipofuscina A2E)^{19, 28-31}. También se ha comprobado que las drusas contienen lípidos y proteínas modificados oxidativamente, lo que apoya la idea de que el estrés oxidativo puede jugar un papel importante en la formación de estos depósitos extracelulares y en el desarrollo de la DMAE^{18, 32}. En cuanto al origen de los componentes de las drusas, la mayoría de los lípidos derivan del metabolismo del EPR y los fotorreceptores, mientras que las proteínas parecen proceder fundamentalmente de las células coroides y el suero¹⁸.

Las drusas se consideran indicadores primarios de los cambios relacionados con la edad que ocurren en la membrana de Bruch. Su prevalencia en individuos mayores de 55 años es muy variable y según distintos estudios oscila entre el 63% y el 96%³³. No todos los individuos

que presentan estos depósitos extracelulares desarrollan DMAE, aunque el tamaño, número, área total y grado de confluencia de las drusas se consideran factores de riesgo³⁴. Por ello es importante distinguir sus características, lo que permite interpretar los hallazgos clínicos y predecir la probable evolución de la patología. Los estudios histológicos y las nuevas técnicas de imagen con resolución cuasi-histológica de la retina han demostrado que estos depósitos extracelulares son diversos en cuanto a estructura y localización³⁵ como se muestra en la Figura 1.5.

Atendiendo a su morfología, las drusas típicas se clasifican en duras y blandas. Las primeras son pequeños depósitos nodulares blanco-amarillentos menores de 63 μm de diámetro, con contornos bien definidos y distribuidas por todo el polo posterior y hasta el ecuador. Reflejan una disfunción del EPR que, en principio, es clínicamente irrelevante. Las drusas blandas son depósitos de material granular de mayor tamaño (> de 63 μm para algunos autores o >125 μm para otros) que presentan bordes mal definidos. Tienen tendencia a agruparse y a ubicarse en la región perifoveal. Con el tiempo tienden a crecer lentamente y a confluir, pudiendo originar desprendimientos del EPR. Se consideran un factor de riesgo para la DMAE, y este riesgo es todavía mayor cuando se acompaña de cambios pigmentarios.

Otros tipos de depósitos extracelulares son las llamadas drusas cuticulares y las drusas reticulares. Las drusas cuticulares (antes, laminares basales) forman agrupaciones densas, tienen típicamente un tamaño de 50-75 μm de diámetro, y se extienden hacia o penetran en la monocapa del EPR. Las drusas reticulares o pseudodrusas, se localizan en el espacio subretiniano justo por encima del EPR, por lo que actualmente se denominan más correctamente como depósitos drusenoides subretinianos. Tienen forma cónica o aplanada, y a menudo están interconectadas, de forma que su tamaño puede oscilar entre los 25 y > 1000 μm . Pueden ser suficientemente grandes como para distorsionar o acortar la capa de fotorreceptores por encima de ellas, y la acumulación de las formas cónicas puede llegar a romper la membrana limitante externa. Los constituyentes de estos dos tipos de depósitos extracelulares son similares a los de las drusas blandas³⁵.

La drusogénesis es un proceso complejo que tiene lugar a lo largo de los años y que puede alterar la función visual a través de efectos directos e indirectos.

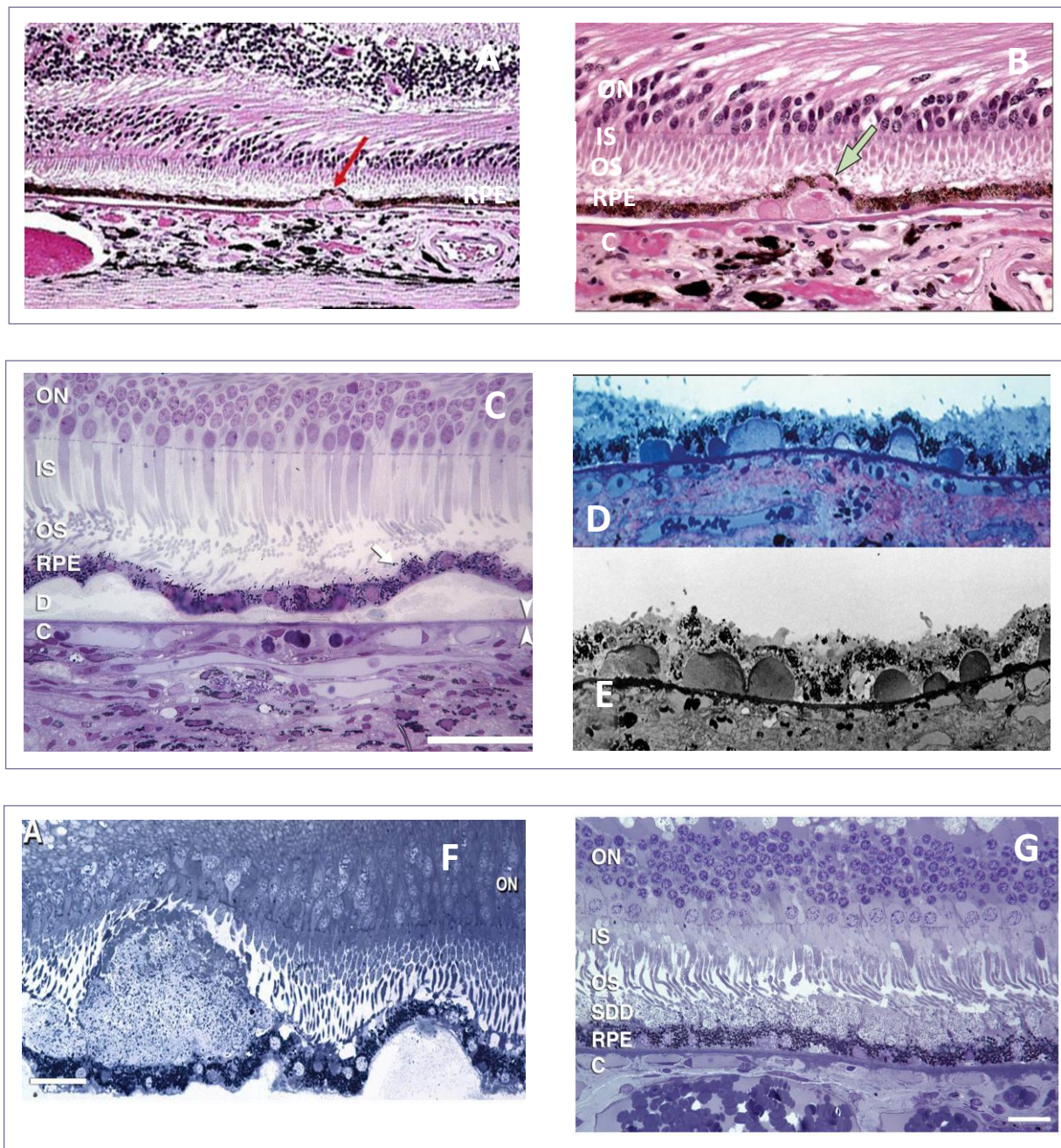


Figura 1.5.- Morfología y localización de diferentes tipos de drusas. (A) Drusa dura pequeña, con material hialino, localizada entre la membrana basal del EPR y la membrana de Bruch. (B) Drusa blanda típica con depósitos hialinos y sustancia granular situada en la capa interna de la membrana de Bruch. Las células del EPR situadas sobre la drusa están comprimidas y disminuyen de tamaño, y los fotorreceptores presentan una débil atrofia. (C) Dos drusas blandas conteniendo residuos membranosos, conectadas entre sí por depósitos lineares basales; la morfología y pigmentación del EPR está mínimamente afectada. La flecha indica gránulos de melanina en la región apical del EPR. Barra: 50 μ m. (D y E) Drusas cuticulares. Con microscopía óptica y electrónica se aprecian numerosas acumulaciones ovoides que penetran en la monocapa del EPR. Obsérvese el adelgazamiento de las células del EPR sobre el ápice de cada drusa. (F) Disposición y ultraestructura de un depósito drusenoidal subretiniano (izquierda) y una drusa blanda (derecha) situadas por encima y por debajo del EPR, respectivamente. Los fotorreceptores sobre el depósito drusenoidal son más cortos. Barra: 25 μ m. (G) Depósitos drusenoides subretinianos aplanados. Barra: 20 μ m. A y B, tinción con eosina-hematoxilina; C, F y G, tinción con azul de toluidina. Imágenes tomadas de Ding *et al.* 2009³², Spaide y Curcio, 2010³⁵ y Coleman *et al.* 2008⁵⁴.

En primer lugar, las drusas pueden afectar al complejo EPR-fotorreceptores (y estructuras próximas) ocasionando el desplazamiento físico de dicho complejo (*desprendimiento drusenoidal*). La consecuencia sería una reducción del aporte de oxígeno al EPR y la dificultad para la transferencia de metabolitos entre éste y la coriocapilar, al aumentar la distancia entre ambas estructuras. Esto provocaría la degeneración del EPR y, finalmente, la de los fotorreceptores. El impacto negativo de las drusas también puede producirse a través de un mecanismo indirecto que supone la activación del sistema inmune y la inflamación local. La identificación de moléculas del complemento en estos depósitos extracelulares, incluyendo el complejo de ataque a la membrana (MAC), ha llevado a proponer una teoría según la cual los eventos inflamatorios a nivel de la membrana de Bruch son factores cruciales en la patogénesis y progresión de la DMAE^{28, 31}. La actividad inflamatoria desencadenada por la presencia de drusas, unida a una regulación defectuosa de la cascada del complemento determinada por factores genéticos, provocaría finalmente la apoptosis y/o necrosis de las células del EPR debida a la activación incontrolada del complemento.

Sea cual fuere el estímulo desencadenante, la consecuencia de la degeneración del EPR es la atrofia de la coriocapilar y la disfunción y muerte de los fotorreceptores con la consiguiente afectación de la visión (Figura 1.6).

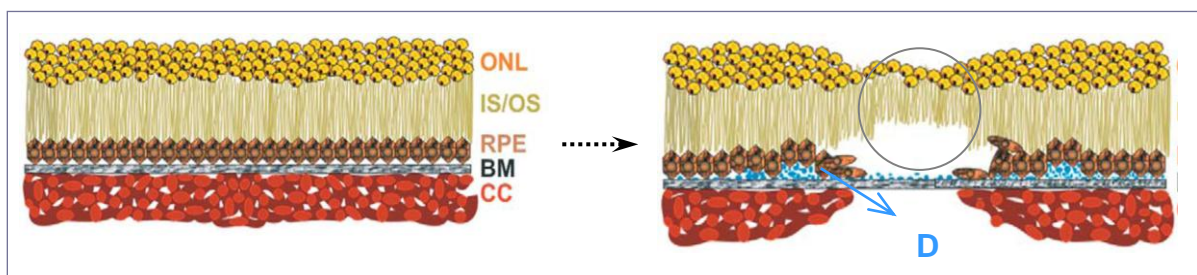


Figura 1.6.- Esquema que muestra la formación de áreas de atrofia local en la retina. La acumulación de drusas (D) entre el epitelio pigmentario retiniano (RPE) y la membrana de Bruch (BM) conduce a la atrofia y apoptosis del RPE y a la consiguiente pérdida de la coriocapilar subyacente (CC) y los fotorreceptores. Estos cambios originan áreas de atrofia en la retina. Los eventos que provocan la muerte de las células del RPE no se conocen con precisión.

El envejecimiento provoca otros cambios estructurales y moleculares en la membrana de Bruch que ocasionan cambios funcionales. El entrecruzamiento de las fibras de colágeno aumenta la densidad y fuerza de la red de colágeno pero disminuye su flexibilidad y capacidad de filtración, afectando negativamente a la permeabilidad de esta membrana y al recambio de

sus componentes. En la zona intermedia se produce un aumento de densidad y una calcificación de las fibras elásticas, lo que provoca una mayor rigidez de la membrana de Bruch y favorece la aparición de grietas y agujeros que facilitan la infiltración de neovasos coroideos hacia el espacio subretiniano. Además, con la edad aumenta el tamaño de las moléculas de proteoglicanos y la fracción de heparán sulfato, cambio que altera la permeabilidad de la membrana y puede jugar un papel en la respuesta antiinflamatoria. Por otra parte, la acumulación de lípidos en la membrana de Bruch aumenta su hidrofobicidad y reduce la conductividad hidráulica, lo que dificulta el tránsito del agua desde el EPR hacia la coroides, favoreciendo su acumulación bajo el EPR y el desprendimiento de éste de la membrana de Bruch (Figura 1.7) ¹⁸.

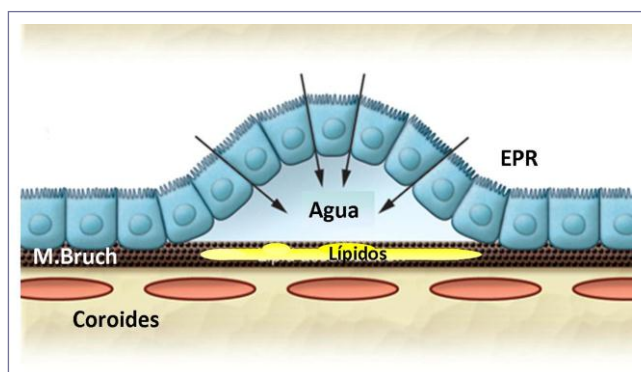


Figura 1.7.- Desprendimiento seroso del epitelio pigmentario retiniano (EPR). La membrana de Bruch se vuelve hidrofóbica a causa de la acumulación de lípidos impidiendo el paso del agua hacia la coriocapilar.

1.2.4.- COROIDES

La retina humana es uno de los tejidos metabólicamente más activos del cuerpo. Para asegurar un suministro adecuado de oxígeno y nutrientes es irrigada por dos sistemas vasculares: la vasculatura retiniana interna abastece a las capas internas de la retina, mientras que los fotorreceptores y el EPR dependen de la circulación coroidea externa. La coroides es un tejido heterogéneo formado por un denso lecho de capilares fenestrados (coriocapilar) que satisface las necesidades metabólicas de la retina externa, una red de nervios simpáticos y parasimpáticos, un sistema arterio-venoso, un estroma pigmentado que contiene melanocitos y fibroblastos, y varios tipos de células derivadas del plasma, incluyendo macrófagos y mastocitos ³¹. La coroides tiene el mayor flujo sanguíneo por unidad de volumen de todo el cuerpo, superando considerablemente al de otros tejidos ricamente vascularizados; así, es 10

veces superior al de la sustancia gris del cerebro y 4 veces el del riñón. Además, el flujo sanguíneo no es uniforme ya que presenta diferencias regionales a lo largo de la coroides, de manera que en la mácula es 7 veces mayor que en la periferia²⁷.

Con el envejecimiento se producen una serie de cambios en la circulación coroidea: reducción del espesor de la coroides desde 200-300 μm al nacimiento hasta 80 μm a los 90 años, disminución de la densidad de la coriocapilar y del tamaño medio de las luces vasculares, y aumento del tamaño de los pilares intercapilares. El resultado es un descenso del flujo vascular coroideo subfoveal que, en principio, no conduce a alteraciones patológicas³⁶. Sin embargo, numerosos investigadores han demostrado mediante diversas tecnologías que en pacientes con DMAE, el flujo sanguíneo coroideo está más reducido que en controles de la misma edad³⁷. Esto ha llevado a proponer que la etiología de la DMAE es atribuible en gran medida a cambios intrínsecos de la coroides; la insuficiencia vascular sería la causa de la disfunción del EPR y finalmente, de la degeneración de los fotorreceptores. Otra hipótesis es que, a la inversa, los cambios en la coroides pueden ser una respuesta a la alteración de los tejidos vecinos. Los cambios degenerativos en el EPR, en los que podrían estar implicados diversos mecanismos (estrés oxidativo, procesos inflamatorios, factores genéticos,..) y/o la alteración de la membrana de Bruch provocarían la pérdida de los factores tróficos derivados del EPR que mantienen la integridad del endotelio vascular, conduciendo a la atrofia de la coriocapilar¹⁵.

Entre los factores vasoactivos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de la estructura de los capilares juega un papel fundamental el factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF. El término VEGF se aplica a una familia de factores de crecimiento que en mamíferos incluye cinco miembros relacionados: VEGF-A (el miembro más abundante y mejor caracterizado al que se conoce como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y PlGF (factor de crecimiento placentario)³⁸. Los VEGFs son proteínas homodiméricas aunque también se han detectado heterodímeros de VEGF-A y PlGF. La complejidad de la familia VEGF aumenta debido a los procesos de corte y empalme alternativo (*splicing*) que sufren los ARN mensajeros de VEGF-A, VEGF-B y PlGF.

El gen *VEGF-A* se localiza en el cromosoma 6p21.3 y está formado por 8 exones y 7 intrones. El *splicing* alternativo de su ARN transcrito origina numerosas isoformas, de las cuales las más importantes son VEGF₁₆₅, la isoforma más abundante y mitogénica, VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ (Figura 1.8A). Estas variantes, designadas colectivamente como VEGF_{xxx}, (donde xxx indica el número de residuos de aminoácidos presentes en los polipéptidos) presentan distinta solubilidad en función de su capacidad para unirse a heparán sulfato: VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ se unen fuertemente por lo que permanecen secuestradas en la membrana de las células del EPR o en la matriz extracelular, VEGF₁₂₁ carece de la región de unión al glicosaminoglicano por lo que es soluble y difunde libremente, y VEGF₁₆₅ se une con poca afinidad aunque también puede asociarse con la matriz³⁹. En el ojo humano adulto, las células del EPR expresan fundamentalmente la isoforma VEGF₁₆₅ y en menor cantidad VEGF₁₂₁ y VEGF₁₈₉. Con el envejecimiento, la expresión de estas isoformas aumenta 9, 23 y 26 veces, respectivamente⁴⁰.

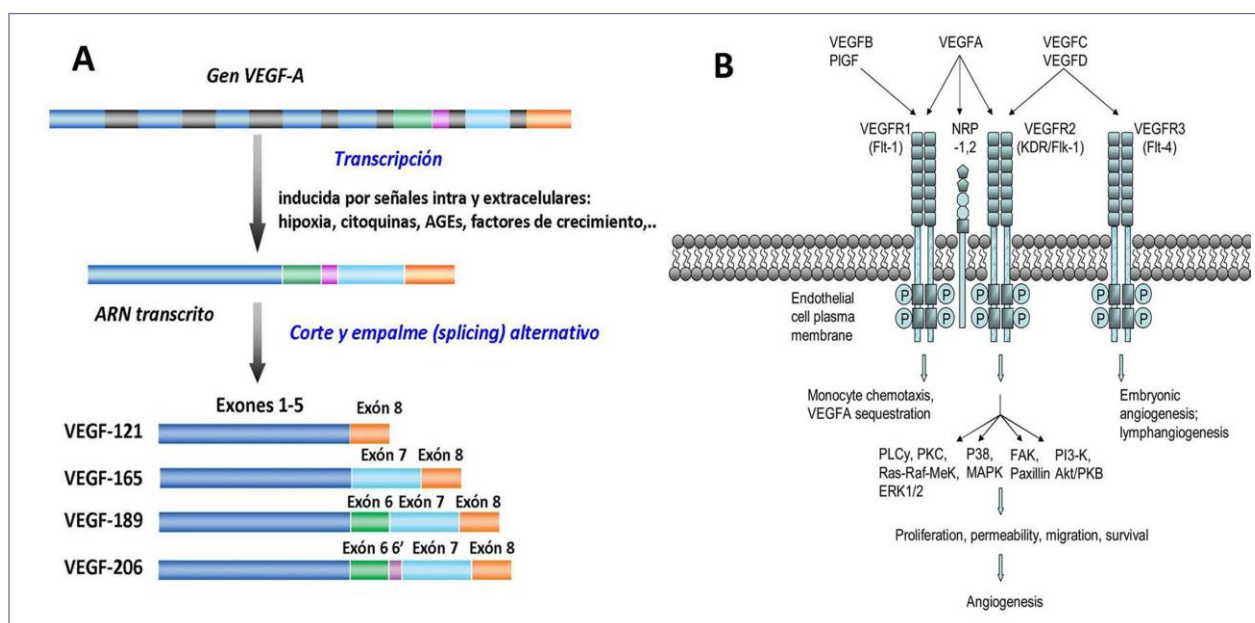


Figura 1.8.- Factor de crecimiento endotelial vascular y angiogénesis. (A) Las distintas isoformas de VEGF-A se forman por *splicing* alternativo del ARN transcrito a partir del gen *VEGF-A*. Los exones 1-5 forman el dominio de unión al receptor, mientras que los dominios 6 y 7 forman el dominio de unión a heparán sulfato. (B) Rutas de señalización de VEGF y funciones biológicas.

La unión de las proteínas VEGF a sus receptores tirosina-quinasa VEGFR-1, -2 y -3 induce la dimerización del receptor y su autofosforilación, lo que provoca la activación de una cascada de señales intracelulares que, en último término, inducen el aumento de

permeabilidad vascular y la angiogénesis (Figura 1.8B). La acción angiogénica del VEGF ocurre fundamentalmente a través de la activación del VEGFR-2^{38, 41}.

En el ojo normal, el VEGF es secretado basolateralmente por las células del EPR de forma constitutiva, y mediante su unión a receptores VEGFR2 presentes en las células endoteliales de los capilares coroideos ejerce múltiples acciones: evita la apoptosis de las células endoteliales, estabiliza las fenestraciones del endotelio y modula la permeabilidad vascular, por lo que su acción es esencial para mantener la integridad del endotelio de la coriocapilar¹⁷. El EPR también secreta otros factores con propiedades vasoactivas como el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), una glicoproteína de 50 kDa que posee propiedades neurotróficas y antiangiogénicas. El balance adecuado de factores angiogénicos y antiangiogénicos es necesario para mantener la naturaleza avascular de la membrana de Bruch y evitar el crecimiento patológico de vasos coroideos hacia la retina externa.

Un desequilibrio entre factores angiogénicos y antiangiogénicos subyace al fenómeno conocido como **neovascularización coroidea** (NVC) que ocurre en una parte de los pacientes afectados por DMAE. Consiste en la formación de nuevos vasos coroideos que penetran la membrana de Bruch y proliferan bajo el EPR o lo atraviesan (Figura 1.9).

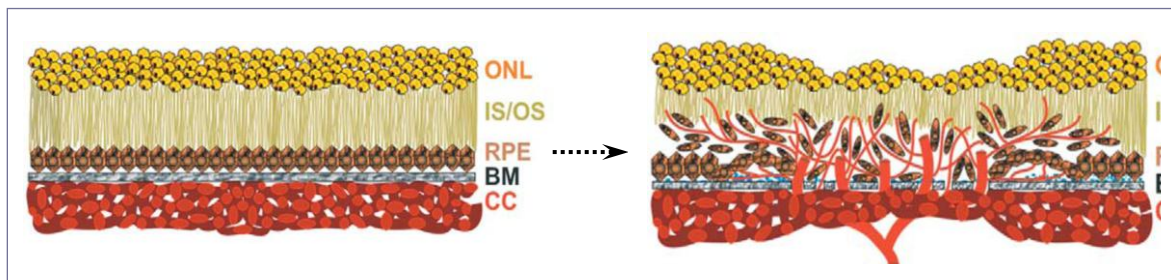


Figura 1.9.- Neovascularización coroidea. Nuevos vasos crecen desde la coroides (CC), atraviesan la membrana de Bruch (BM) y proliferan bajo el epitelio pigmentario retiniano (RPE) o lo traspasan y crecen en el espacio intrarretiniano. Estos neovasos liberan exudados y son frágiles, originando frecuentemente sangrados. La pérdida de visión suele ser rápida y severa a causa de la alteración de la interfase fotorreceptor-RPE.

En muchos aspectos, la NVC se asemeja a los procesos de cicatrización⁴². La NVC se acompaña de una mayor permeabilidad y fragilidad de los neovasos, lo que puede conducir a hemorragias subretinianas, exudación de fluido, desprendimiento del EPR, formación de cicatrices fibróticas, o una combinación de estos elementos. La consecuencia es una pérdida

rápida de la visión en el área macular. El estímulo concreto que precipita la NVC no se conoce pero se sabe que se asocia a un aumento de la producción de VEGF por las células del EPR⁴³. Este aumento podría ser la respuesta del EPR a una situación de hipoxia a la que podrían contribuir diversos factores tales como una disminución del flujo sanguíneo en la coriocapilar, cambios degenerativos en la membrana de Bruch y/o formación de depósitos y drusas confluentes³⁷. En condiciones hipóxicas, se activan los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) que aumentan la expresión del gen VEGF, con lo que se promueve la angiogénesis. La detección de los factores inducibles por hipoxia HIF-1 α y HIF-2 α en células de EPR y endotelio presentes en las membranas neovasculares^{44, 45} apoya la idea de que la hipoxia puede jugar un papel importante en la neovascularización coroidea en la DMAE. Sin embargo, no se pueden descartar otras posibilidades ya que se ha demostrado que el estrés oxidativo y la inflamación mediada por el sistema del complemento, condiciones que como se ha mencionado ocurren en la DMAE, también estimulan la producción de VEGF por las células del EPR^{39, 40, 46, 47}.

Todo lo anterior lleva a la conclusión de que la patogénesis DMAE es un proceso complejo y no bien conocido que puede dar lugar a distintos fenotipos y que sólo puede ser comprendido como resultado de eventos moleculares y celulares en los que están implicados el complejo [fotorreceptores – EPR – membrana de Bruch – coriocapilar], y probablemente factores sistémicos, como esquematiza la Figura 1.10.

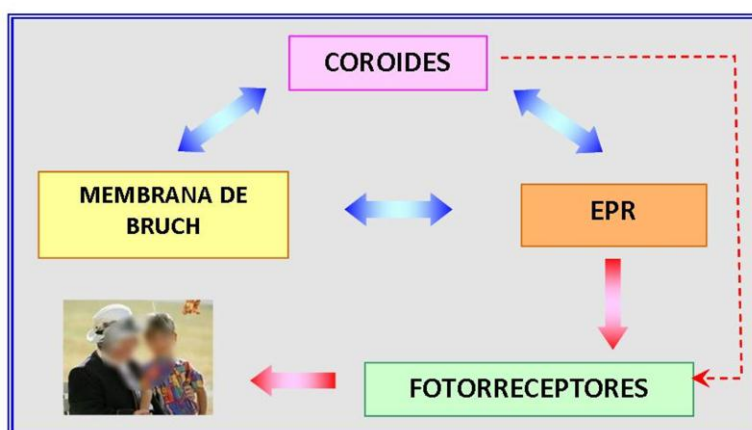


Figura 1.10.- La DMAE como patología del complejo fotorreceptores-EPR-membrana de Bruch-coriocapilar.

1.3.- FENOTIPOS Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA DMAE

1.3.1.- CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE DMAE

Existen diferentes definiciones de la DMAE pero de forma sencilla se puede decir que es una patología asociada al envejecimiento y caracterizada por la *aparición de alteraciones degenerativas progresivas en el área macular de la retina que se asocian a pérdida de la visión central*. La DMAE supone un conjunto de cambios fenotípicos del polo posterior que tiene su expresión en una variedad de manifestaciones clínicas. En los estadios previos lo frecuente es encontrar drusas y cambios pigmentarios sin afectación de la función visual, y en los estadios avanzados, se caracteriza por neovascularización coroidea, desprendimientos del EPR, desgarros del EPR, atrofia geográfica y fibrosis parcial o total. Esto explica la compleja manifestación de la enfermedad basada en una enorme expresividad patogénica.

Al ser un trastorno complejo, es necesario establecer unos criterios uniformes y universales que permitan comprender su etiología, predecir el riesgo de progresión y permitir la comparación de los diferentes estudios epidemiológicos y clínicos. Se han creado una variedad de sistemas para la clasificación y gradación de la enfermedad. Algunos ejemplos son el “*Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading*”⁴⁸, el “*Internacional Classification Age-Related Maculopathy*”⁴⁹, el “*Age-Related Eye Disease Study Grading*” (AREDS) en sus diferentes versiones^{50,51} y el “*Clinical Age-Related Maculopathy System*” (CARMS)⁵².

Son muy utilizados el Sistema Internacional y la Clasificación de Wisconsin, basados ambos en hallazgos fundoscópicos a partir de fotografías estereoscópicas, sin tener en cuenta criterios angiográficos o clínicos, como la agudeza visual. En ellos se identifican dos entidades: una forma precursora, la maculopatía asociada a la edad (MAE), y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) propiamente dicha que es la consecuencia de la progresión de la MAE. A su vez, se distinguen dos modalidades de DMAE: la variedad atrófica (DMAE *seca*) y la neovascular (DMAE *exudativa*). En otros sistemas como el AREDS o el CARMS, se establece una gradación en estadios en función de la evolución de la patología, distinguiéndose entre DMAE temprana, intermedia y avanzada. La DMAE avanzada viene definida por la atrofia geográfica y/o la presencia de neovascularización.

Aunque los criterios de los distintos sistemas de clasificación no son superponibles en todos los aspectos que se analizan para tipificar las distintas formas de la patología, en lo esencial son coincidentes.

I. Maculopatía asociada a la edad

En la MAE pueden coexistir elementos como: hiperpigmentación o hipopigmentación del EPR y/o drusas duras y drusas blandas. Los conceptos de dura y blanda no son superponibles en el sistema internacional y el Wisconsin. En la retinografía (Figura 1.11), las drusas duras se visualizan como depósitos amarillentos hialinos, inferiores a 63 μm de diámetro, de contornos bien delimitados y distribuidos por todo el polo posterior. Las drusas blandas son más grandes (más de 125 μm de diámetro) y sus bordes están peor definidos. Tienen mayor tendencia a agruparse y a ubicarse en la región perifoveal. Con el tiempo tienden a crecer lentamente y a confluir, dando lugar a desprendimientos drusenoides del EPR, aunque se aconseja reservar este término para lesiones mayores de 1000 μm y que afecten al centro de la fóvea. Es muy frecuente que se acompañen de cambios pigmentarios en el área macular. Las llamadas drusas cuticulares (o laminares basales) son engrosamientos nodulares de la membrana basal del EPR. Se manifiestan como múltiples lesiones bien delimitadas, pequeñas (diámetro inferior a 50 μm), de color blanco amarillento, que suelen aparecer agrupadas en las arcadas vasculares y la región peripapilar. Las drusas reticulares, pseudodrusas o depósitos drusenoides subretinianos corresponden a depósitos extracelulares situados por encima del EPR que suelen localizarse en torno a la papila. A diferencia de las variaciones en tamaño y densidad que muestran las drusas típicas, las drusas reticulares presentan un aspecto uniforme, su apariencia es sinusoidal o irregular y se desarrollan formando un patrón característico en red⁵³. No obstante, la distinción por funduscopía entre las drusas reticulares y las drusas típicas es difícil y se requiere el empleo de otras técnicas de imagen. En ocasiones, las drusas pueden calcificarse; las drusas calcificadas presentan un aspecto brillante, con contornos abruptos y bien definidos.

En los sistemas de gradación de la DMAE en diferentes estadios, la presencia de drusas, en número y tamaño variable según el sistema considerado, y/o cambios pigmentarios se consideran características de la DMAE temprana.

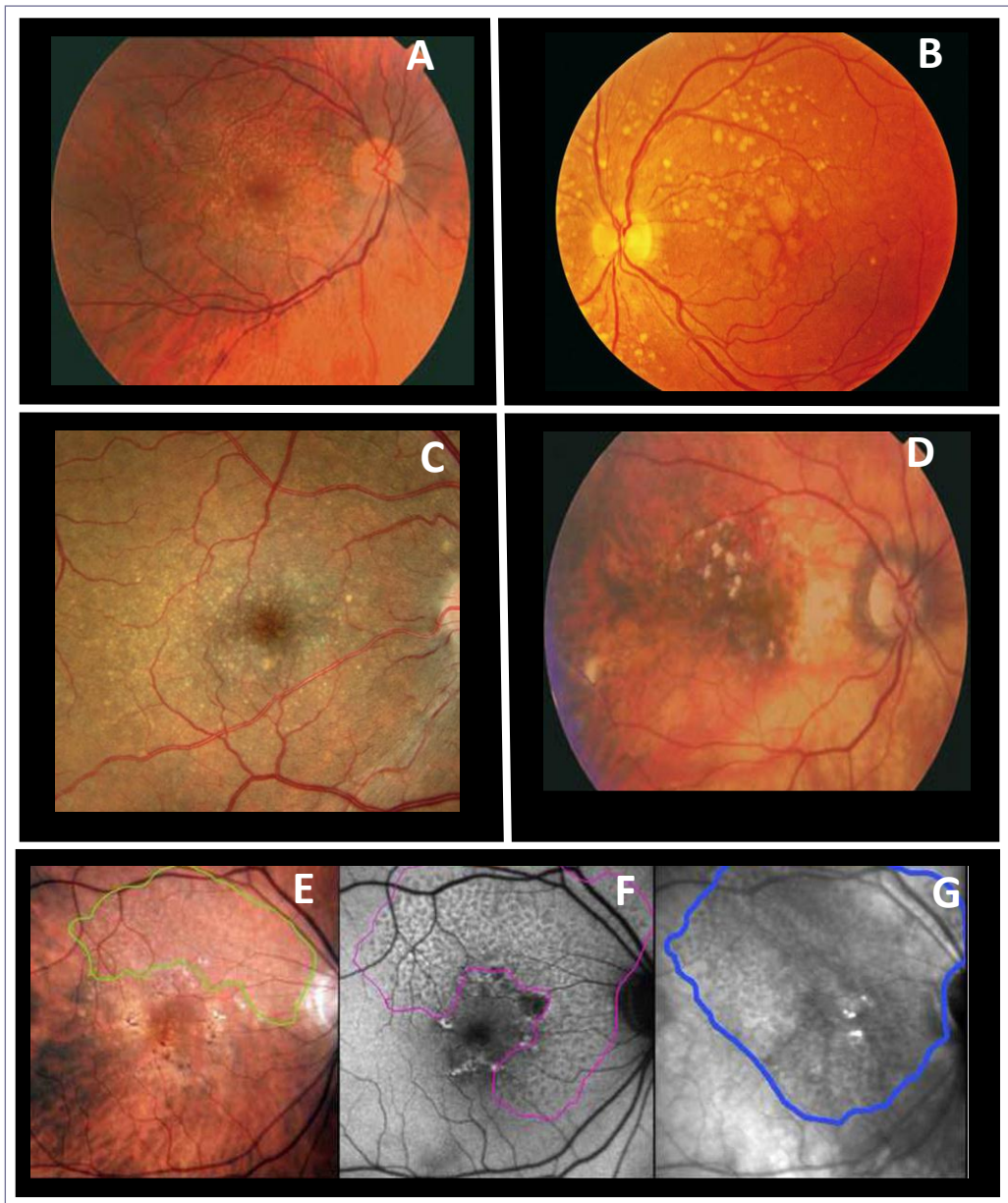


Figura 1.11.- Retinografías que muestran la apariencia de diversos tipos de drusas. (A) Drusas duras asociadas a cambios pigmentarios. (B) Ojo izquierdo de un paciente con MAE en el que se observan grandes drusas blandas. (C) Drusas cuticulares: pequeñas, uniformes, formando agrupaciones densas (aparición de “cielo estrellado”). La distinción con otras drusas de tamaño similar puede ser difícil sólo con la retinografía. (D) Drusas calcificadas asociadas a atrofia del EPR. (E, F y G) Patrón de drusas reticulares (pseudodrusas, o depósitos drusenoides subretinianos) visualizado con diferentes modalidades de imagen. E: La retinografía en color con refuerzo de contraste muestra un patrón de drusas reticulares en los cuadrantes superiores delimitados por la línea verde; F: La imagen obtenida por autofluorescencia permite observar el patrón reticular en tres cuadrantes delimitados por la línea morada; G: La imagen obtenida con luz infrarroja muestra el patrón en los cuatro cuadrantes extendiéndose a través de la mácula central.

Se ha estudiado la evolución temporal de las lesiones de la MAE y se sabe que las drusas duras son de bajo riesgo de progresión de la enfermedad, las laminares basales de riesgo intermedio, y las demás, de riesgo elevado, lo cual debe ser tenido en cuenta para la planificación del seguimiento de estos pacientes.

II A. DMAE atrófica o seca

La DMAE atrófica es la forma más común y su característica fundamental es la atrofia progresiva del EPR⁵⁴. Puesto que el EPR secreta factores esenciales para el mantenimiento de la integridad de la coriocapilar y proporciona soporte metabólico a los fotorreceptores, la consecuencia de la pérdida de células del EPR es la atrofia de la coriocapilar, la degeneración gradual de los fotorreceptores, la disminución del espesor retiniano y un impedimento visual progresivo. En casos severos, la atrofia retiniana puede extenderse a las capas plexiforme externa y nuclear interna. Cuando este proceso degenerativo conduce al desarrollo de un área de más de 175 μm de diámetro en la que hay pérdida total de la retina, EPR y coriocapilares bajo la capa epitelial, se habla de *atrofia geográfica*. Si esta zona atrófica se localiza en la zona central de la mácula se denomina *atrofia geográfica central*.

En la retinografía se observa un área de despigmentación retiniana con bordes delimitados en la que se visualizan los vasos coroideos (en ausencia de NVC en el mismo ojo). En la periferia de estas áreas hipopigmentadas se aprecia frecuentemente hiperpigmentación debido a la proliferación compensatoria de las células del EPR (Figura 1.12).

II B. DMAE neovascular, húmeda o exudativa

La presencia de neovascularización coroidea activa (o de las secuelas de ésta) es la característica que define a la DMAE exudativa o neovascular. A través de un proceso aún no bien conocido, una serie de estímulos conducen, en último término, al desarrollo de capilares coroideos que atraviesan la membrana de Bruch y crecen en el espacio sub-EPR o infiltran la retina si atraviesan también el EPR.

Las características específicas de estos capilares determinan la disfuncionalidad de la región macular, ya sea por hiperpermeabilidad, con acúmulo de fluido a nivel intra, subretiniano o sub-EPR, o por aparición de hemorragias. También son característicos los

desprendimientos serosos o hemorrágicos del EPR o de la retina neurosensorial. En la fase cicatricial, el tejido retiniano es sustituido por tejido fibrótico originando la denominada cicatriz disciforme. Para el diagnóstico preciso y el seguimiento de la DMAE neovascular se requieren, además de la retinografía (Figura 1.12), la angiografía fluoresceínica y la tomografía de coherencia óptica.

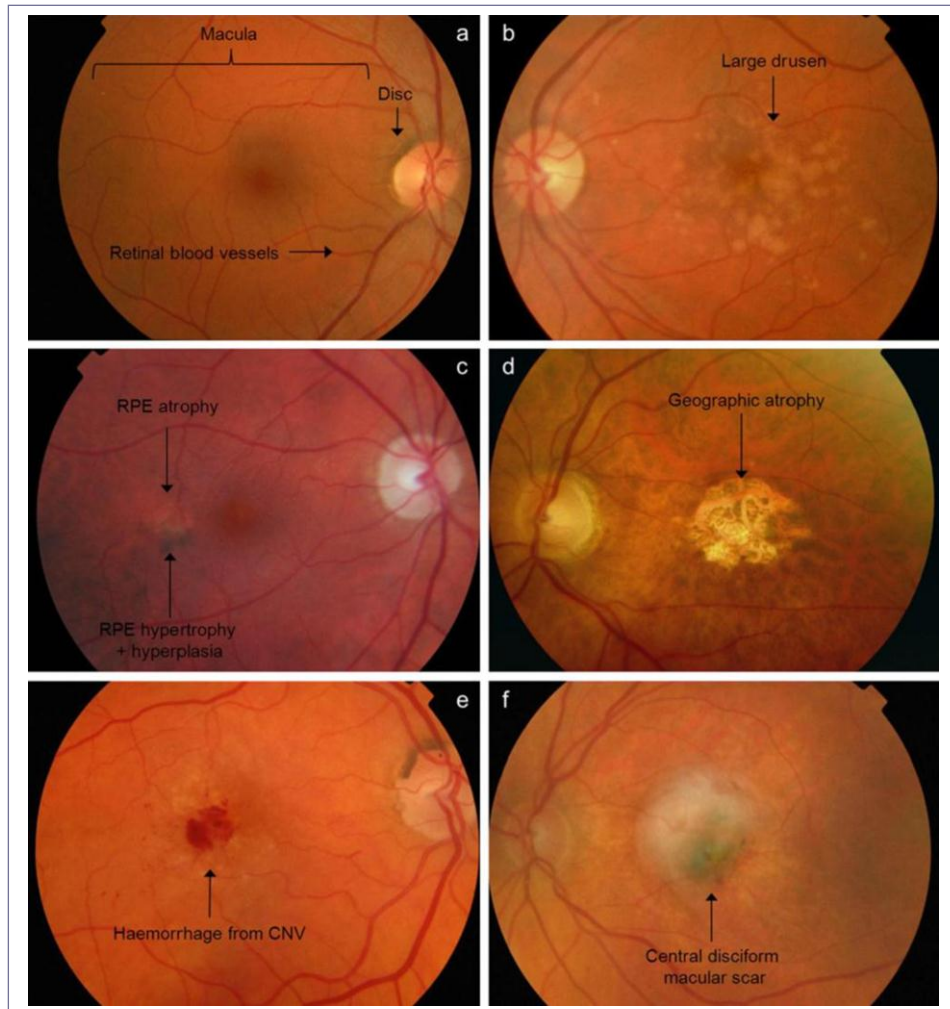


Figura 1.12.- Retinografías que muestran diferentes estados de degeneración macular asociada a la edad. (a) Ojo normal. El disco óptico sirve como referencia anatómica durante el examen clínico. (b) DMAE temprana. Se observan grandes drusas que aparecen como manchas amarillentas. (c) Irregularidades pigmentarias en DMAE temprana. Se aprecia un área de hiperpigmentación (debido a hipertrofia e hiperplasia de las células del EPR) e hipopigmentación (por atrofia del EPR). (d) Atrofia geográfica en DMAE avanzada con pérdida de visión central. El paciente presenta una extensa área de atrofia del EPR. También se aprecia atrofia de los vasos coroideos subyacentes. (e) Neovascularización coroidea en DMAE exudativa. Los neovasos patológicos han provocado una hemorragia en la retina, lo que causa una brusca pérdida de visión central. (f) Cicatriz disciforme en una DMAE avanzada no tratada; en este estado, la visión central estará afectada irreversiblemente. Tomada de Khandhadia *et al.* 2012¹⁵⁶.

Aunque la DMAE neovascular representa sólo el 10-15% de la prevalencia total de la DMAE, es responsable de más del 80% de los casos de pérdida de visión severa o ceguera legal⁵⁵. A diferencia de lo que sucede en la DMAE atrófica, la pérdida de la visión central asociada a la DMAE neovascular suele ser aguda.

El espectro de la DMAE neovascular se amplió en 1990 con la **vasculopatía coroidea polipoidea (VCP)**⁵⁶ y en 2001 con la **proliferación angiomasosa retiniana (RAP)**⁵⁷. La VCP es considerada un subtipo de la DMAE exudativa aunque la etiopatogenia es completamente distinta. Existen unas lesiones típicas, que consisten en una red de neovasos procedentes de la circulación coroidea terminadas en unas dilataciones aneurismáticas de aspecto polipoideo. Típicamente esta patología causa desprendimientos serosos y hemorrágicos del EPR en el polo posterior y puede cursar de forma aguda o crónica, lo que explica la clínica variable de estos pacientes. Cuando la hemorragia aparece por el estallido de un pólipo, la sintomatología es brusca. Si las paredes desestructuradas del pólipo van provocando exudación, se visualizan depósitos lipídicos en el fondo del ojo. En la mayoría de los casos, se observa una combinación de ambos signos. El diagnóstico precisa de angiografía con verde de indocianina.

En la RAP, la manifestación más temprana es una proliferación capilar dentro de la retina que se origina a partir del plexo capilar profundo en el área paramacular (NVC intrarretiniana). El tejido angiomasoso avanza en sentido vertical hacia los límites anterior y posterior de la retina. En este estadio, puede haber edema intrarretiniano y múltiples hemorragias de pequeño tamaño. En un segundo estadio (NVC subretiniana) la NVC pasa la capa de fotorreceptores. En el tercer estadio se forman anastomosis retino-coroideas. Este patrón de neovascularización es menos frecuente que la neovascularización típica de la DMAE exudativa. La RAP supone aproximadamente un 10% de los casos diagnosticados con DMAE exudativa y tiende a afectar a la población anciana de raza blanca.

1.3.2.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO POR TÉCNICAS DE IMAGEN

I. Angiografía fluoresceínica (AFG)

La fluoresceína intravenosa comenzó a utilizarse en los años cincuenta para la visualización mediante oftalmoscopia de la circulación de los tumores coroideos. Pero la

técnica de la angiografía fluoresceínica (AFG) con fotografías seriadas de la retina tras la inyección del colorante en una vena periférica fue descrita por dos estudiantes, Novotny y Alvis, en 1961⁵⁸ y ha sido el pilar diagnóstico en casos de sospecha de DMAE neovascular⁵⁹.

La AFG se basa en el fenómeno de la fluorescencia que es la propiedad de una sustancia (en este caso la fluoresceína) para emitir parte de la energía radiante que recibe en forma de luz visible con una longitud de onda mayor que la de la luz incidente. En el proceso, la molécula de fluoresceína sódica se excita con una luz azul de 465-490 nm. Al pasar a un estado más estable, emite una luz verde-amarillenta de 520-530 nm que impresiona una película en blanco y negro. Actualmente se utilizan angiógrafos digitales.

La molécula de fluoresceína sódica es soluble en agua y poco tóxica. Una vez inyectada en la vena antecubital, se une hasta en un 80% a proteínas plasmáticas en particular a la albúmina. La concentración plasmática máxima de la fluoresceína se alcanza inmediatamente después de la administración intravenosa, decayendo rápidamente en los primeros 10 minutos. En condiciones normales, el contraste no atraviesa las barreras hemato-retinianas. Los vasos retinianos están provistos de un endotelio no fenestrado y numerosas moléculas de adhesión que impiden el paso de la fluoresceína a su través, constituyendo así el componente principal de la barrera hemato-retiniana interna. Por ello, los vasos retinianos no fugan en condiciones normales. La barrera hemato-retiniana externa está constituida por ligamentos de unión (zónulas adherentes y ocluyentes) a nivel del EPR que impiden la difusión del contraste desde la coriocapilar, cuyos capilares fenestrados sí son permeables a la fluoresceína, hacia la retina. Además, la presencia de pigmentos en el EPR (melanina y lipofuscina) contribuye a un bloqueo de la señal, que es máximo a nivel macular. Por lo tanto, en condiciones de integridad del EPR no se observará fuga del compuesto fluorescente. Por debajo de la coriocapilar, se sitúan los grandes vasos coroideos que son impermeables a la fluoresceína.

Tras la inyección de la fluoresceína, se realiza un conjunto de fotografías seriadas que recogen las fases correspondientes al llenado de los dos sistemas vasculares, el retiniano y el coroideo: fase prearterial (inicio del llenado de los vasos coroideos), fase arterial (comienza el llenado de arterias retinianas), fase arteriovenosa (llenado completo de arterias), fase venosa precoz (se completa el llenado de capilares y se observa el flujo laminar venoso), fase venosa

media (aumento de fluorescencia venosa y disminución de la arterial) y tardía (hiperfluorescencia de los bordes de la papila y desaparición final). La utilidad de esta técnica es que permite la valoración de la integridad de las barreras hemato-retinianas, así como la integridad de la barrera óptica producida por el EPR.

La AFG no suele ser necesaria para el control de la DMAE atrófica ya que en estos casos son suficientes la retinografía y la autofluorescencia. Sin embargo esta técnica es muy útil para el estudio de las membranas neovasculares asociadas a la DMAE exudativa ya que permite describir el patrón de neovascularización coroidea, el componente de la lesión y su localización respecto a la fóvea.

- Por su aparición angiográfica, existen dos patrones básicos de neovascularización: clásica y oculta.

a) *Neovascularización coroidea clásica:*

Presenta un patrón caracterizado por un área bien delimitada de hiperfluorescencia brillante en la fase inicial, con un escape de fluorescencia en las fases intermedias y tardías que desborda los límites de la lesión ocultando el complejo neovascular. Las membranas clásicas tienden a crecer más rápidamente que las ocultas y deterioran la visión de manera más precoz. Suelen estar localizadas por encima del EPR. Solamente un pequeño porcentaje de ojos con DMAE exudativa se manifiesta inicialmente con este tipo de neovascularización.

b) *Neovascularización coroidea oculta:*

En contraste con la forma clásica, los neovasos crecen entre la capa interna de la membrana de Bruch y el EPR. Este tipo de neovascularización es más difícil de diagnosticar por AFG ya que no sigue el patrón angiográfico clásico, aunque sí que existen signos sugerentes de la presencia de una membrana. Por ejemplo, en las fases precoces se observan signos que no son característicos: hiperfluorescencia irregular, hiperfluorescencia diferida, o relleno de la malla neovascular, que desaparecen en las fases intermedias de la AFG. Sin embargo, en tiempos tardíos pueden evidenciarse signos característicos de la neovascularización subretiniana como difusión de colorante y acúmulo en un desprendimiento seroso de la retina

asociado, o la hiperfluorescencia moteada que puede observarse en la superficie de un desprendimiento del EPR (DEP).

Se pueden distinguir dos patrones fluorescentes de neovascularización oculta: *DEP fibrovascular*, en el que existe una elevación irregular del EPR que muestra una hiperfluorescencia punteada o heterogénea entre 1-2 minutos de la inyección de fluoresceína, y *el escape tardío de origen indeterminado*, que corresponde a una fuga en el EPR que aparece en la fase tardía, de la que no puede identificarse el origen en las imágenes previas del angiograma. La pérdida de visión en pacientes con membranas neovasculares ocultas puede ser lenta, debido a las alteraciones progresivas en el EPR, o puede agravarse bruscamente a causa de un sangrado o de la evolución hacia una forma clásica.

- En cuanto al término “lesión”, hace referencia a la lesión entera neovascular en la que quedan incluidos los siguientes componentes: la NVC (clásica u oculta), la sangre, el pigmento, los DEP serosos, las cicatrices y los exudados duros. Según la proporción de lesión ocupada por cada tipo de NVC, se habla de:
 - *NVC predominantemente clásica*: la NVC clásica ocupa al menos un 50% de toda la lesión.
 - *NVC mínimamente clásica*: la NVC clásica ocupa menos del 50% del área de toda la lesión.
 - *NVC predominantemente oculta*: la NVC oculta ocupa al menos un 50% de la lesión.
 - *NVC clásica sin componente oculto*. La lesión contiene NVC clásica pero no NVC oculta. Como en la lesión puede haber otros componentes, como sangre, el término no es sinónimo de NVC clásica.
 - *NVC oculta sin componente clásico*. Es una lesión oculta sin NVC clásica. Por la misma razón que en el caso anterior, no es lo mismo que una NVC sólo oculta.

En la evolución de una lesión, una forma oculta se puede convertir en clásica cuando los neovasos atraviesan la capa del EPR. Según los estudios de Schneider⁶⁰, la conversión a NVC predominantemente clásica es de 23% si proceden de forma oculta sin componente clásico y hasta 70% si proceden de NVC mínimamente clásica. La Figura 1.13 muestra patrones angiográficos característicos de distintos tipos de neovascularización coroidea.

- Según su localización con respecto a la fovea, las NVC clásicas se consideran:
 - *extrafoveales*: situadas como mínimo a 200 μm del centro geométrico de la zona avascular foveal (ZAF).
 - *yuxtafoveales*: aquellas cuyo borde posterior está localizado entre 1 y 199 μm del centro de la ZAF.
 - *subfoveales*: se encuentran debajo de la ZAF.

Se ha descrito que la frecuencia relativa de cada tipo es en torno a 80% subfoveales, 15% yuxtafoveales y 5% extrafoveales⁶¹.

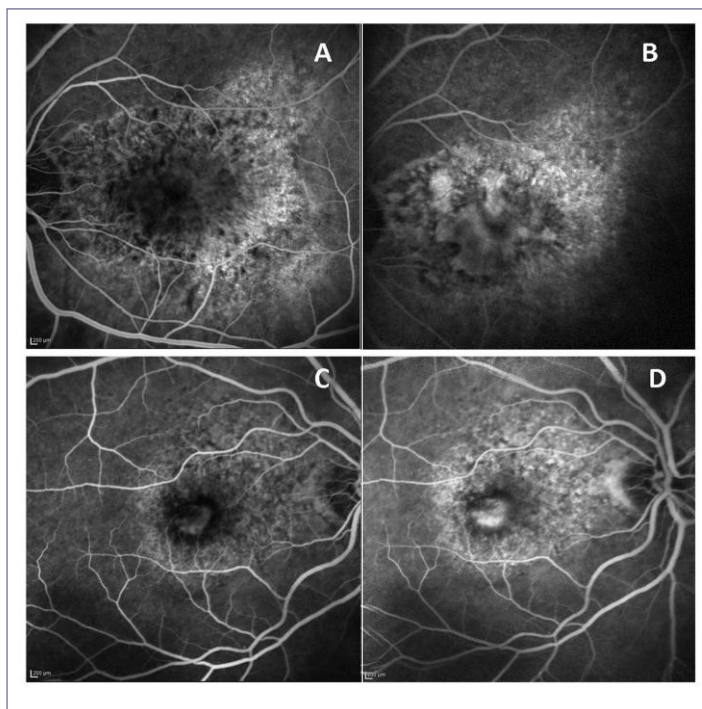


Figura 1.13.- Angiografía fluoresceínica para el estudio de la neovascularización coroidea. (A y B) Neovascularización oculta. A tiempos iniciales se observa imagen de hiperfluorescencia en encaje (A). A tiempos medios se aprecia difusión del colorante (B). (C y D) Neovascularización predominantemente clásica. En tiempos precoces ya se observa hiperfluorescencia (C). Tiempos tardíos, con aumento de la hiperfluorescencia (D).

II. Angiografía con verde de indocianina (AVI)

Las limitaciones de la AFG para el estudio de la NVC oculta se pueden subsanar en gran medida con la angiografía con verde de indocianina (AVI). Las propiedades de esta molécula la hacen más útil para ver la circulación coroidea. Absorbe luz en el rango cercano del infrarrojo

(790-805 nm) y su espectro de emisión presenta un máximo a 835 nm. El EPR sólo absorbe un 21-38% de la luz del infrarrojo cercano de 800 nm usada en la AVI, por lo que se pueden identificar estructuras por debajo de dicho EPR.

Esta técnica permite además la visualización a través de capas finas de sangre, pigmento y exudados turbios. Por otra parte, la indocianina circula prácticamente en su totalidad ligada a las proteínas plasmáticas por lo que difunde poco o nada a través de la coriocapilar, obteniéndose imágenes nítidas de los vasos y lesiones de la coroides.

La AVI no aporta información adicional relevante a la de la AFG para el estudio de las drusas y no suele ser necesaria para la caracterización de las NVC clásicas. Tampoco permite el estudio del EPR puesto que éste absorbe un pequeño porcentaje de la luz del infrarrojo cercano por lo que carece de indicación en el diagnóstico de la DMAE atrófica. Sin embargo, es de gran utilidad en el estudio de las NVC ocultas (Figura 1.14), especialmente cuando cursan con desprendimiento seroso del EPR ⁶².

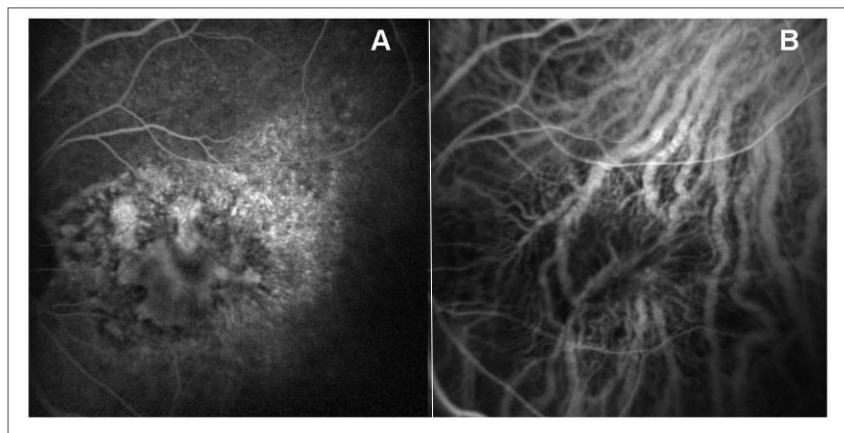


Figura 1.14.- Neovascularización oculta en angiografía fluoresceínica (A) y con verde de indocianina (B). La circulación coroidea sólo es visible en la angiografía con verde de indocianina; en angiografía fluoresceínica el EPR bloquea la señal.

También es una prueba importante para el diagnóstico de la proliferación angiomasitosa retiniana (RAP) ⁵⁷, ya que permite la visualización de la anastomosis de los vasos retinianos y coroides (Figura 1.15). Asimismo es la prueba con mayor especificidad y sensibilidad para detectar la vasculopatía coroidea polipoidea (VCP) ⁶³ (Figura 1.16).

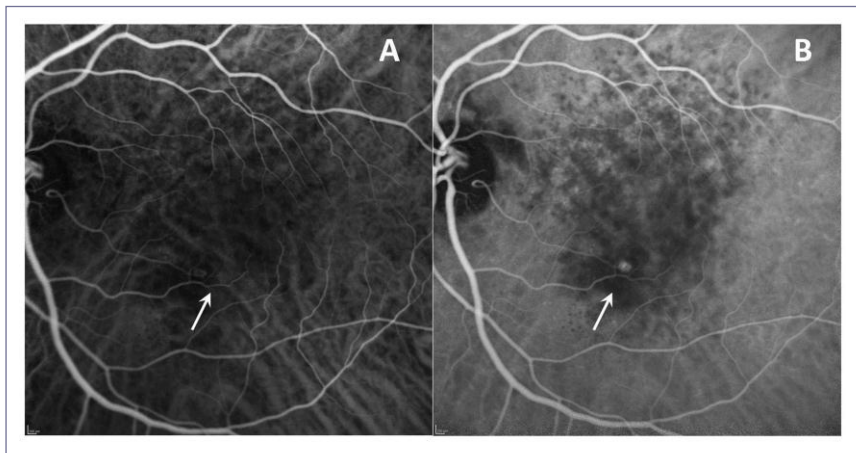


Figura 1.15.- Proliferación angiomatosa retiniana (RAP) en angiografía con verde de indocianina. (A) Tiempos iniciales: se dibuja la comunicación entre circulación retiniana de arteria temporal inferior y coroidea (flecha). (B) Tiempos tardíos: se observa marcada hiperfluorescencia del RAP, que lo hace fácilmente reconocible.

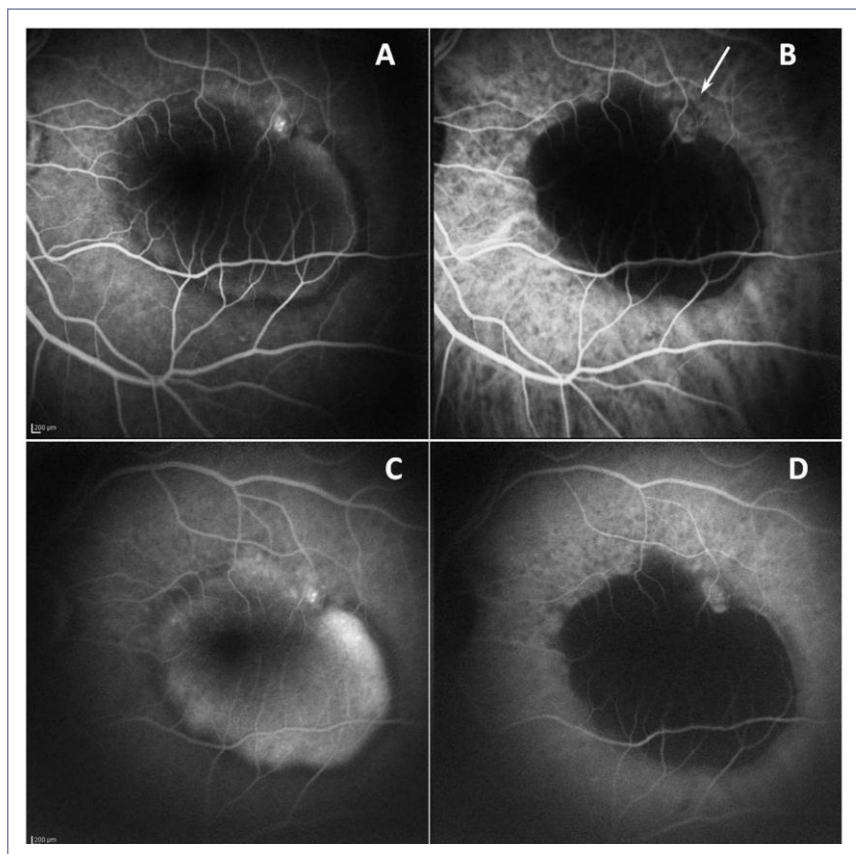


Figura 1.16.- Vasculopatía coroidal polipoidea (VCP). (A y C) Imágenes de angiografía fluoresceínica (AFG). (B y D) Imágenes de angiografía con verde de indocianina (AVI). Arriba, tiempos precoces; abajo, tiempos tardíos. La fluoresceína se acumula en la zona desprendida en tiempos tardíos. La AVI permite visualizar claramente la estructura polipoidea (flecha).

III. Tomografía de coherencia óptica (OCT)

La tomografía de coherencia óptica (OCT), desarrollada por Huang y Swanson⁶⁴ en 1991, es una técnica de imagen rápida y no invasiva mediante la cual se obtienen imágenes tomográficas de alta resolución de los tejidos biológicos. Funciona en forma análoga al ultrasonido, pero utiliza luz infrarroja cercana en lugar de sonido para discriminar diferencias intrínsecas de las estructuras en los tejidos. Los primeros usos médicos fueron en oftalmología, donde tiene una importancia creciente. La OCT comenzó a utilizarse para el diagnóstico y seguimiento de patologías maculares aunque posteriormente sus aplicaciones se han extendido a otros campos como el glaucoma. Su principal avance consiste en que permite obtener imágenes de la retina *in vivo* con resolución micrométrica, a partir de las cuales es posible caracterizar su microanatomía normal y definir con precisión la localización y la naturaleza de los cambios patológicos microscópicos de la mácula.

La OCT se basa en un principio óptico complejo denominado interferometría de baja coherencia y se realiza mediante un interferómetro de coherencia cuyo funcionamiento se muestra esquemáticamente en la Figura 1.17.

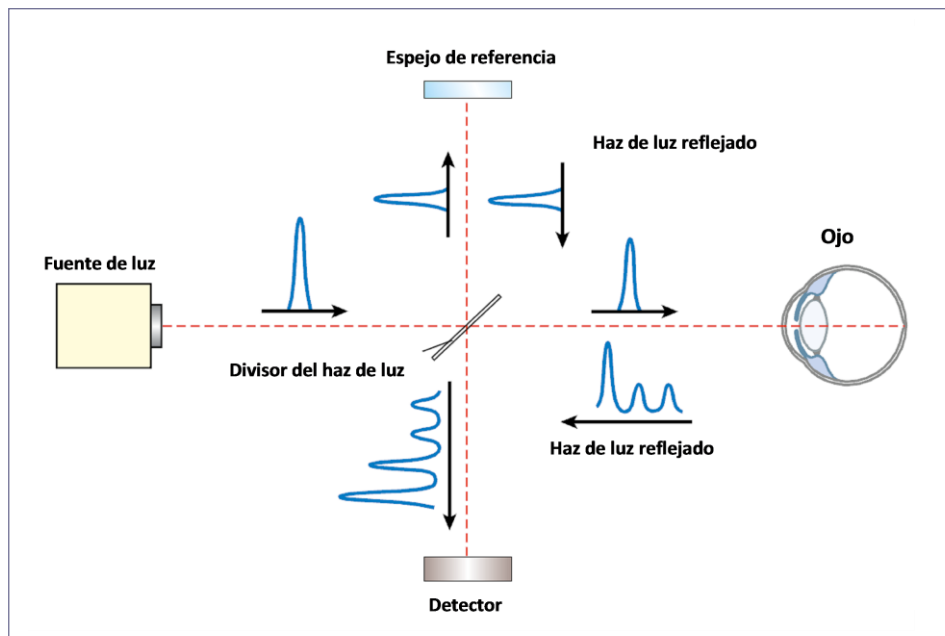


Figura 1.17.- Interferometría de baja coherencia. Esquema que muestra el funcionamiento de la tomografía de coherencia óptica (OCT).

Un láser diodo superluminiscente es la fuente de luz monocromática que emite un haz de luz infrarroja (820 nm) dirigido a un divisor de haces que lo desdobla en dos rayos diferentes. Uno de ellos es enviado a un espejo de referencia, situado a una distancia conocida, desde el cual se reflejará sin cambios; el otro se dirige al ojo y penetra en la retina dispersándose por las diferentes capas del tejido. La luz reflejada de regreso consistirá en múltiples ecos provocados por las diferencias en la distancia y las características intrínsecas de las microestructuras oculares. Un interferómetro procesa los rayos referencia y señal, comparando la diferencia de tiempo entre ambos haces de luz reflejados. Los rayos se recombinan y el resultante es emitido a un fotodetector mediante el cual se procede a su digitalización y procesamiento por una computadora.

Las imágenes son presentadas en escala de colores o de grises, de forma que los tejidos que más reflejan la luz se representan en los colores rojo y blanco, los que menos lo hacen aparecen en azul y negro, y los de reflectividad moderada se muestran en amarillo o verde, o en gama de grises (Figuras 1.18 y 1.19). El color representa las propiedades ópticas de los tejidos, no a estos en sí mismos. Se trata por tanto de una imagen no real pero que sí representa las verdaderas dimensiones de las estructuras medidas.

En la actualidad existen dos sistemas dentro de la OCT: el de dominio temporal y el de dominio espectral, que se diferencian en que la detección de las señales interferométricas se realiza en función de tiempo o de frecuencias ópticas, respectivamente. Los inicios de la OCT fueron con el dominio temporal y desde 2001 se dispone de la OCT de dominio espectral. Las principales diferencias entre ellas consisten en que en la OCT de dominio temporal el espejo de referencia es móvil y el detector es único, mientras que en la OCT de dominio espectral el espejo es fijo y la detección de la señal OCT se realiza mediante un espectrómetro con un fotodetector multicanal de alta velocidad. Estas diferencias técnicas confieren ventajas a la OCT de dominio espectral (SD-OCT): una mayor resolución axial ($\sim 5 \mu\text{m}$ vs $10 \mu\text{m}$), lo que implica una mejor visualización de las diferentes capas de la retina; mayor velocidad de escaneo por segundo (entre 18.000 y 40.000 A-scans vs 400), con la consiguiente rapidez en la obtención de las imágenes; posibilidad de crear imágenes en 3D; y mayor reproducibilidad ya que la capacidad de escaneo sobre el mismo punto en dos tomas diferentes es muy superior⁶⁵.

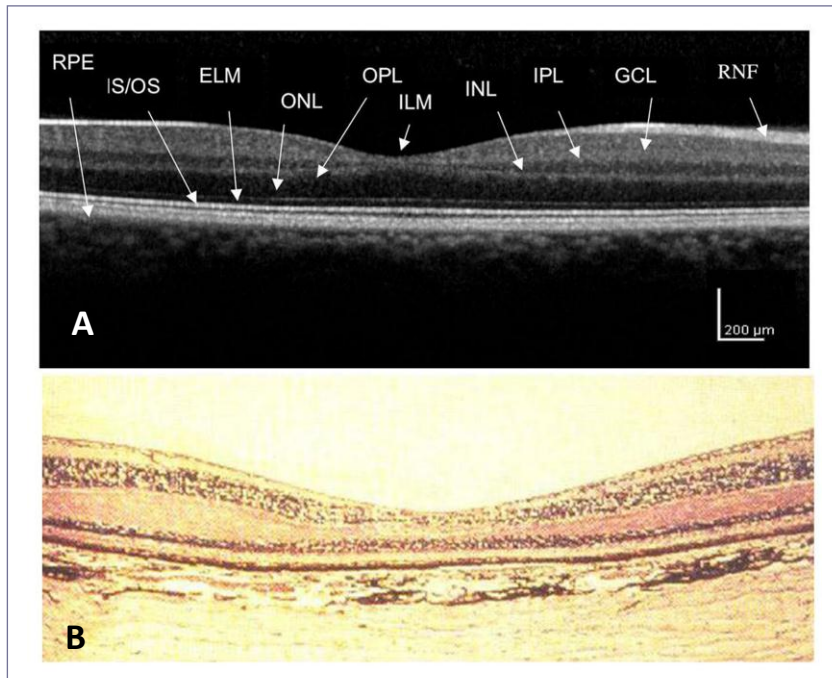


Figura 1.18.- Imagen tomográfica de la mácula normal obtenidas por medio de OCT de dominio espectral (A) y corte histológico a través de la zona macular (B). Se pueden visualizar en la imagen de OCT las distintas capas retinianas. De dentro hacia fuera: membrana limitante interna (ILM), capa de fibras nerviosas de la retina (RNF), capa de células ganglionares (GCL), plexiforme interna (IPL), nuclear interna (INL), plexiforme externa (OPL), nuclear externa (ONL), membrana limitante externa (ELM), línea de unión entre segmentos internos y externos de los fotorreceptores (IS/OS), epitelio pigmentario de la retina (RPE). La hiperreflectividad difusa por debajo del EPR corresponde a la unión de la membrana basal con la coriocapilar. Imagen tomada de Maheshwary *et al.* 2010²⁵⁶.

Estas diferentes características se traducen en una mejor visualización de las imágenes adquiridas mediante OCT de dominio espectral con respecto a las que ofrece la OCT de dominio temporal. Dentro de los diferentes equipos de OCT de dominio espectral, el Spectralis-HRA de la casa comercial Heidelberg cuenta con la tecnología "Eye tracking" (compensación activa de los movimientos oculares). Spectralis utiliza fuentes de luz diferentes que permiten adquirir simultáneamente dos imágenes diagnósticas. Un rayo láser explora permanentemente el fondo de ojo, observa los movimientos de éste y sirve como referencia para poder conducir al segundo rayo precisamente sobre la posición apropiada para la adquisición de la imagen de sección transversal. En sentido figurado, este seguidor de ojo activo "congela" el barrido OCT sobre la imagen de fondo del ojo manteniéndolo siempre exactamente en la posición deseada, incluso en caso de movimientos oculares. La Figura 1.19 muestra la evolución en la calidad de las imágenes obtenidas con los diferentes sistemas de OCT.

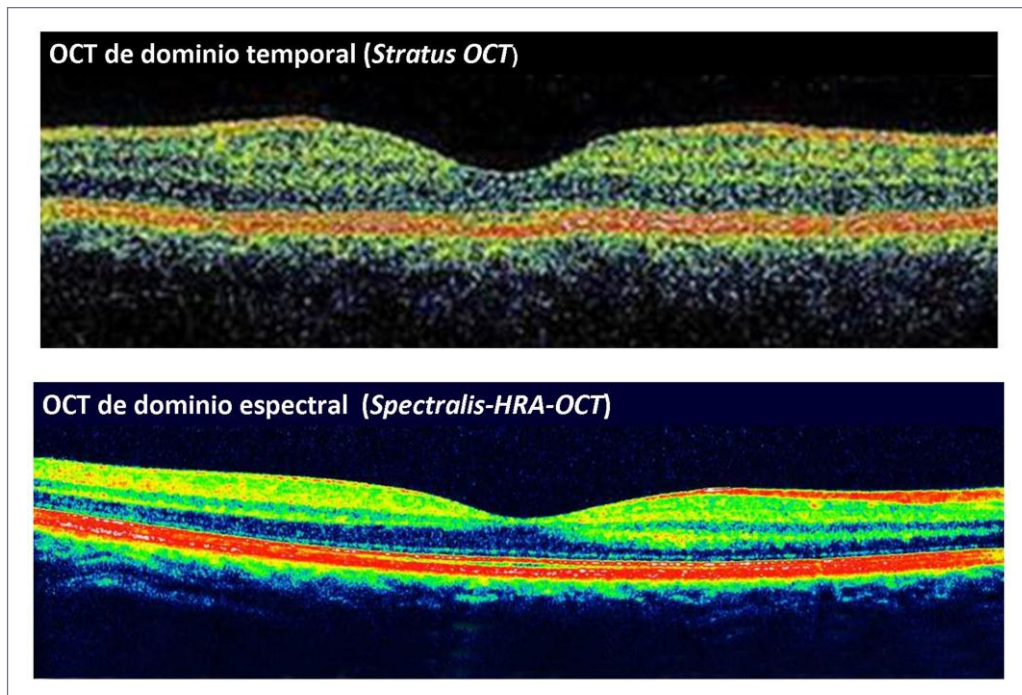


Figura 1.19.- Imágenes tomográficas de la mácula normal con OCT de dominio temporal y OCT de dominio espectral. La imagen de la mácula del ojo derecho de la doctoranda, obtenida con el equipo *Spectralis-HRA*, muestra una excelente resolución ($4\ \mu\text{m}$), lo que permite la visualización de las diferentes capas de la retina.

Hoy en día, la OCT es una técnica de gran utilidad para visualizar, prácticamente a nivel histológico, los cambios patológicos maculares que ocurren en la DMAE⁶⁶. Las drusas aparecen como engrosamientos y deformaciones del EPR que pueden formar irregularidades y ondulaciones de la banda hiperreflectante correspondiente al mismo. Permite detectar la reducción del grosor retiniano y el incremento en la reflectividad del EPR, que es el resultado de la menor capacidad que presenta el tejido retiniano atrófico para atenuar la luz (Figura 1.20).

En particular, la OCT constituye una herramienta fundamental en el diagnóstico y manejo de los pacientes con neovascularización coroidea. Mediante esta técnica se puede localizar la membrana neovascular activa y determinar su extensión, es útil para evaluar la afectación subfoveal, ayuda a diagnosticar las membranas ocultas en las que la AGF muestra patrones confusos, y es muy valiosa para el seguimiento de la respuesta a los tratamientos (Figura 1.21).

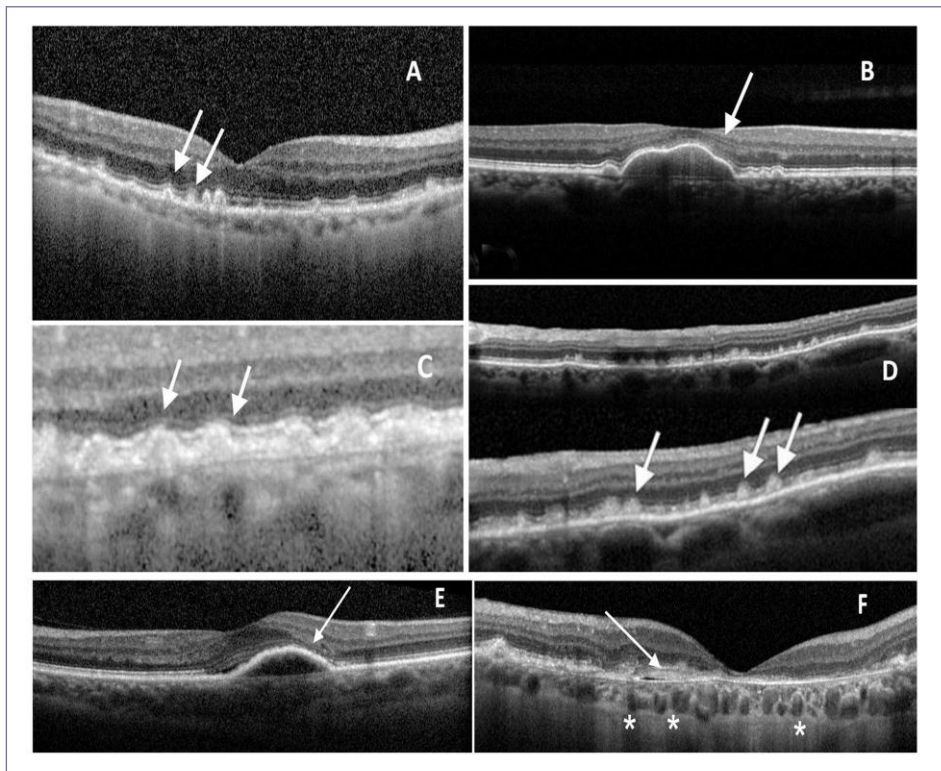


Figura 1.20.- Imágenes de OCT representativas de alteraciones maculares presentes en la DMAE. (A) Drusas maculares que elevan las líneas del EPR y la de unión de los segmentos externos e internos de los fotorreceptores (línea IS/OS) pero no las interrumpen sugiriendo que se mantiene la integridad de ambas estructuras. (B) Deposición de material bajo el EPR. (C) Drusas cuticulares que se visualizan como depósitos de forma triangular cuyas bases se apoyan sobre la membrana de Bruch con los vértices dirigidos hacia la retina. (D) Depósitos retinoides subretinianos. Obsérvese que se localizan por encima de la línea del EPR. Abajo: aumento al 200%. (E) Desprendimiento del EPR indicado por la elevación de la línea del EPR. Contenido hiporreflectivo. Mínimo acúmulo de líquido subretiniano. (F) Atrofia severa del EPR macular. Desaparición de las líneas del EPR e IS/OS de los fotorreceptores. La señal de la coriocapilar (*) está potenciada al no haber efecto pantalla del EPR.

En base a la OCT, las lesiones se clasifican en tres tipos:

- tipo 1: equivale a las membranas ocultas de la AFG. Corresponde a un área hiporreflectiva bajo la línea del EPR, al cual levanta en forma de DEP. Es típico el líquido subretiniano. La VCP se incluye como una variante de este tipo I.
- tipo 2: equivale a las membranas clásicas de la AFG. Corresponde a una estructura hiperreflectiva por encima de la línea del EPR, que levanta la retina neurosensorial. Habitualmente coexiste con lesiones tipo 1.
- tipo 3: o la RAP. Se observan quistes intrarretinianos asociados a un pequeño DEP.

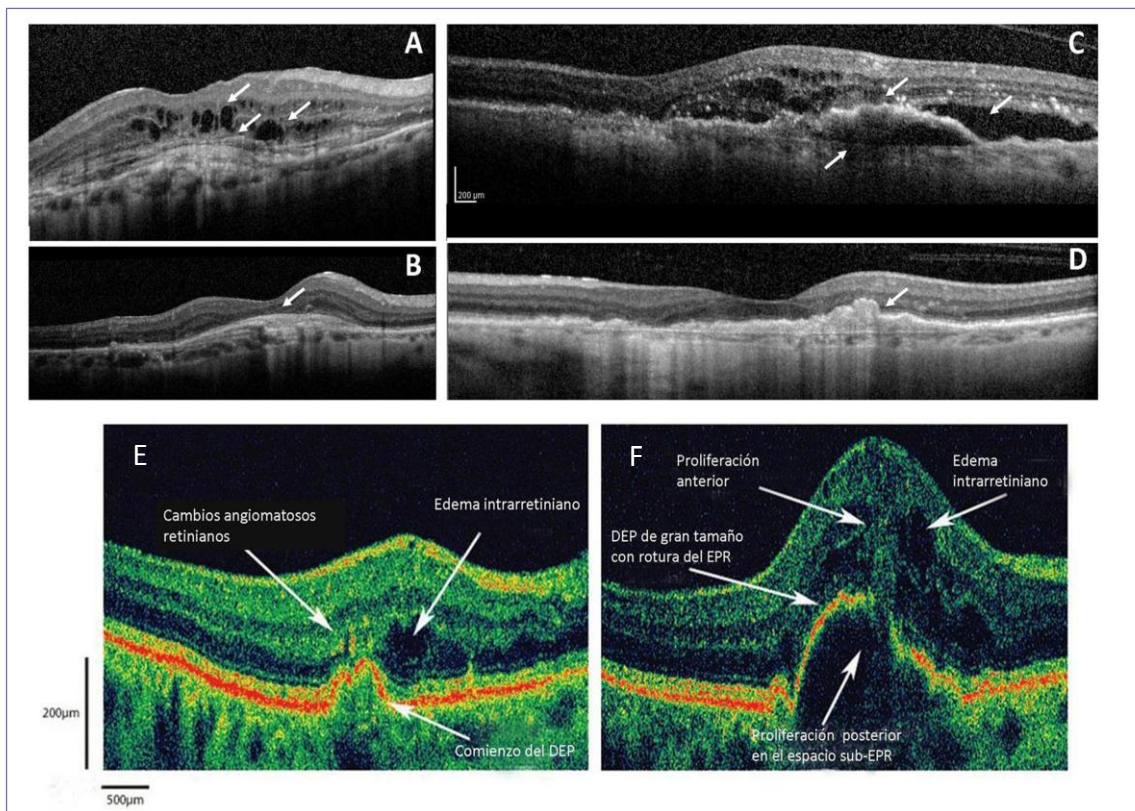


Figura 1.21.- Estudio de patologías exudativas con OCT. (A) Neovascularización predominantemente clásica. Se aprecia una banda hiperreflectiva sobre la línea del EPR que corresponde a la membrana, presencia de quistes intrarretinianos y aumento difuso del espesor de las capas plexiformes. La imagen tomográfica sugiere actividad de la lesión. (B) Mismo paciente de la imagen anterior. Con tratamiento se ha logrado la inactividad de la lesión. Disminución del espesor retiniano central y desaparición de los quistes. Permanece la banda hiperreflectiva de la membrana. (C) Neovascularización oculta activa. Coexisten líquido intra, subretiniano y desprendimiento del EPR. (D) Neovascularización oculta sin actividad. Desaparición del líquido a todos los niveles. Permanece irregularidad severa de la línea del EPR. (E) Proliferación angiomasosa retiniana (RAP). Se aprecian áreas hiperreflectivas que corresponden a los cambios angiomasos, así como neovascularización intrarretiniana con edema intrarretiniano. (F) Desprendimiento del EPR de gran tamaño y proliferación angiomasosa desde la retina profunda a través de una rotura en el EPR. No se evidencian signos que sugieran la presencia de un complejo neovascular coroideo.

El estudio de la retina mediante la OCT ha pasado a formar parte de la rutina habitual en el diagnóstico y manejo de los pacientes con DMAE exudativa. Aporta información de la actividad de las membranas neovasculares que es esencial para determinar la necesidad de instaurar tratamiento, evaluar la respuesta al mismo y detectar signos precoces de recurrencia de las lesiones. La importancia adquirida ha sido tal que varios estudios multicéntricos para evaluación de protocolos de tratamiento con fármacos antiangiogénicos han sido diseñados contando con los parámetros tomográficos obtenidos mediante OCT como criterio exclusivo o principal de retratamiento, con preferencia a los parámetros clínicos y los retinográficos (véase sección 1.8).

1.3.3.- SINTOMATOLOGÍA

Las manifestaciones clínicas de la DMAE incluyen pérdida de agudeza visual, pérdida de sensibilidad al contraste, alteración en la visión de los colores, aparición de escotomas y presencia de metamorfopsias.

El síntoma más característico es la disminución de la agudeza visual o visión central, por lo que la repercusión funcional es grande aunque sea infrecuente la amaurosis al conservarse la visión periférica. La agudeza visual se define como la capacidad para observar los detalles en condiciones de máximo contraste. El grado de pérdida visual dependerá del tipo de DMAE y del tiempo de evolución de la enfermedad. En la DMAE atrófica, en general, este parámetro disminuye de forma lenta y progresiva, de manera que el paciente puede llevar un tiempo más o menos prolongado sin notar síntoma alguno. Sin embargo, las lesiones vasculares asociadas a la forma exudativa de la DMAE causan una pérdida grave de agudeza visual como se ha comprobado en diversos estudios en las ramas en que no se llevó a cabo ningún tratamiento. Así en el estudio *TAP*, hasta un 60% de los pacientes no tratados perdía tres o más líneas de visión a 24 meses de seguimiento⁶⁷. Igualmente en el estudio *MARINA*, el cambio promedio de agudeza visual del grupo no tratado después de 24 meses fue de 10 letras ETDRS respecto a la línea base⁶⁸. Se han llevado a cabo estudios que ilustran los efectos del retraso en la instauración de tratamiento y subrayan la necesidad de su pronta aplicación para evitar pérdida de visión irreversible^{69, 70}.

La sensibilidad al contraste es la capacidad para distinguir patrones en condiciones de bajo contraste. La disminución de este parámetro es una consecuencia frecuente de la DMAE exudativa. Si se observa la evolución natural de la enfermedad, se comprueba que la mitad de los pacientes con NVC subfoveal pierden seis o más letras del optotipo Pelli-Robson (Figura 1.22) tras 24 meses de seguimiento⁷¹. La sensibilidad al contraste juega un papel fundamental en la lectura⁷², la capacidad de reconocer caras, subir y bajar escaleras, etc.

Por otra parte, se ha constatado que los pacientes con DMAE presentan defectos inespecíficos para la visión de los colores⁷³. La intensidad de la alteración parece ser proporcional a la pérdida de agudeza visual.

El término escotoma se refiere a la pérdida de sensibilidad retiniana en un área del campo visual. En la DMAE, los escotomas son centrales o paracentrales, interfiriendo de forma importante en la vida del sujeto, al impedir la fijación ⁷⁴. En los pacientes con escotoma central, se desarrolla una fijación excéntrica en el margen de la lesión, aunque conforme aumenta la distancia a la fovea, menor es la densidad de conos y en consecuencia, menor la resolución de la imagen.

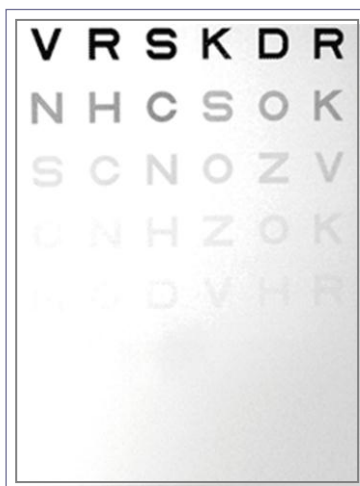


Figura 1.22.- Optotipo de Pelli-Robson. Mide la sensibilidad al contraste a una frecuencia espacial de 6 ciclos por grado. La prueba se realiza a 1 m y con iluminación estándar.

La metamorfopsia es una distorsión visual consistente en la alteración de la percepción del tamaño y la forma de los objetos. Es rara en la forma atrófica y cuando aparece puede indicar la evolución de las lesiones. En la forma exudativa de la DMAE, la pérdida de agudeza visual suele ir asociada a metamorfopsia, aunque sólo un tercio de los pacientes la perciben de manera espontánea ⁷⁵.

Para la detección de los escotomas y de la metamorfopsia se diseñó la rejilla de Amsler. Es importante que los pacientes con lesiones de MAE se autoexploren en casa, de forma monocular, con cierta periodicidad. La aparición de NVC puede ser unilateral o bilateral asimétrica, con lo que puede permanecer desapercibida para el paciente hasta que ocluyen el ojo menos afectado de manera casual, o hasta que la pérdida es demasiado intensa. En cuanto a la dependencia de los pacientes afectados por DMAE, en el estudio *Salisbury Eye Evaluation* ⁷⁶ se determinó que para reconocer una cara era necesaria una agudeza visual de 0,4, para leer a una velocidad de noventa palabras por minuto 0,65, para marcar un número de teléfono

0,2, para introducir una llave en una cerradura 0,3, para enchufar un aparato 0,5, para bajar escaleras 0,2 y para subirlas 0,1.

1.4.- FACTORES DE RIESGO

La DMAE es un trastorno multifactorial en cuyo desarrollo y progresión influyen factores demográficos, ambientales, médicos, oculares y genéticos. Los factores de riesgo identificados en numerosos estudios epidemiológicos incluyen: edad, raza/grupo étnico, sexo, tabaquismo, obesidad, hipertensión, trastornos cardiovasculares, exposición a la luz, cirugía de cataratas previa y predisposición genética. Como se expone a continuación, las evidencias científicas no siempre son consistentes respecto a la fortaleza de la asociación de cada uno de ellos con la patología macular.

I. Edad

La edad es el factor de riesgo más importante para la DMAE. Todos los estudios realizados en diferentes poblaciones confirman que la prevalencia de la DMAE se incrementa con la edad^{54, 77, 78}. Así, en el *Beaver Dam Eye Study* (BDES) llevado a cabo en EEUU con 4926 individuos de raza blanca, la prevalencia fue del 0.8%, 3.7% y 9.5% en los grupos de edades entre 60-69, 70-79 y superiores a 80 años, respectivamente. En el *Los Angeles Latino Eye Study* (LALES) realizado en California con poblaciones México-americanas (n = 5875), la prevalencia observada para los mismos grupos de edades fue de 0.3%, 1.5% y 8.5%. En el *Barbados Eye Study* con 2374 individuos de raza negra, la prevalencia fue de 0.4%, 0.7% y 1.0%, respectivamente. Los resultados de un reciente estudio realizado con población española (n = 2132) revelan la misma tendencia: la prevalencia de DMAE aumenta desde el 1.3% en individuos en la franja de edad entre 65-74 años hasta el 8.5% en los mayores de 80 años⁶. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios a gran escala con poblaciones europeas (*Rotterdam*, 1990-1993; *Eureye*, 2000-2003; *Pola*, 2002-2006).

Se ha propuesto que el aumento del riesgo para DMAE asociado a la edad puede estar mediado por la acumulación gradual de daño a la retina causado por el estrés oxidativo diario. Las alteraciones de la membrana de Bruch que ocurren con el envejecimiento y/o la pérdida

de la función fisiológica normal de las células del EPR también pueden contribuir a la formación de drusas presentes en la retina con DMAE³².

II. Etnicidad

La etnicidad es un factor de riesgo para la DMAE. Los estudios iniciales para estimar la prevalencia de la enfermedad se realizaron con poblaciones de origen europeo en diferentes países occidentales pero en los últimos años se han llevado a cabo análisis a gran escala en otras áreas geográficas, así como en diferentes subgrupos étnicos dentro de poblaciones occidentales, principalmente en EEUU. Los resultados demuestran consistentemente que la prevalencia total de DMAE avanzada es mayor en poblaciones caucásicas blancas que en otros grupos étnicos^{78, 79}. Los valores más bajos corresponden a afroamericanos, chinos y japoneses con prevalencias del 0.34%, 0.55% y 0.67%, respectivamente. En el otro extremo, las poblaciones islandesas y groenlandesas muestran prevalencias del 3.47% y 9.24%.

La razón de estas diferencias entre grupos étnicos no está clara. Se ha sugerido que los niveles incrementados de melanina podrían aumentar la capacidad del EPR, membrana de Bruch y coroides para eliminar radicales libres, con la consecuente protección contra el daño oxidativo y el riesgo de DMAE avanzada⁸⁰. Actualmente se piensa que pueden estar relacionadas con la distinta distribución entre los diferentes grupos étnicos de variantes de riesgo y protectoras de genes relacionados con la DMAE. Así, se ha demostrado que existe una asociación positiva entre la frecuencia del alelo de riesgo Y402H del gen *CFH* (factor H del complemento) en estos grupos y la prevalencia de la DMAE avanzada⁷⁹. Los individuos de origen africano constituyen una excepción, por lo que se ha postulado que la presencia de genotipos protectores y/o diferencias en factores de riesgo como tabaquismo, exposición a la luz solar o dieta podrían explicar la baja prevalencia de DMAE en estas poblaciones.

III. Sexo

El sexo femenino se ha considerado un factor de riesgo en los individuos de más de 75 años en base a los resultados de algunos estudios a gran escala como *Beaver Dam Eye Study*, *Blue Mountains Eye Study* o *Eureye*. Por el contrario, otros estudios como el *Rotterdam*, han hallado una prevalencia más baja en mujeres. Un reciente meta-análisis de 24 estudios a gran

escala que implican a un total de 113780 personas y 17236 casos de DMAE ha concluido que no hay una asociación significativa entre el sexo femenino y la DMAE⁷⁷.

IV. Tabaquismo

La relación entre el tabaquismo y la DMAE se ha investigado en numerosos estudios y meta-análisis. En la gran mayoría de ellos se ha encontrado una asociación significativa entre el hábito de fumar y el desarrollo de la DMAE, y se ha concluido que los fumadores tienen un riesgo incrementado de desarrollar la patología al menos 5-10 años antes que los no fumadores^{77, 81}. Este riesgo es 2-3 veces mayor para los fumadores que para las personas que nunca han fumado⁸².

El mecanismo exacto por el que el hábito de fumar puede afectar a la retina, el EPR o la coroides no se conoce, pero se han propuesto distintas posibilidades tales como reducción de los niveles de antioxidantes circulantes (i.e. vitamina C y carotenoides plasmáticos), generación de especies reactivas del oxígeno y daño oxidativo a la retina, inducción de hipoxia, alteración del flujo sanguíneo coroideo y activación de rutas inflamatorias³². Se ha demostrado que el benzopireno, uno de los compuestos más tóxicos del humo de los cigarrillos, daña al DNA mitocondrial de células de EPR humano, altera la morfología mitocondrial y aumenta la expresión de citoquinas y de diversos componentes del complemento⁸³. Así, el hábito de fumar puede incrementar la actividad inflamatoria del EPR/coroides senescente y/o promover la actividad inflamatoria en este tejido a una edad más temprana. También se ha comprobado que el extracto del humo de cigarrillos es un potente inductor de daño oxidativo y apoptosis en células de EPR humano⁸⁴. Estos efectos, que son contrarrestados por los antioxidantes glutatión y N-acetil cisteína, probablemente contribuyen a la patogénesis de la DMAE.

V. Obesidad, hipertensión y trastornos cardiovasculares

La obesidad, la hipertensión y una historia de enfermedad cardiovascular también se han descrito como factores de riesgo con una moderada asociación con la DMAE pero no todos los estudios muestran consistentemente este resultado^{54, 77}.

VI. Exposición a la luz

Ha habido considerable interés en determinar si la exposición a la luz solar es un factor de riesgo para el desarrollo de DMAE. Sin embargo, los resultados obtenidos son conflictivos ya que algunas investigaciones han hallado que la exposición a la luz ultravioleta y visible puede contribuir a la DMAE, mientras que en otras no se ha observado esta asociación^{54, 85}.

VII. Predisposición genética

Además de los factores demográficos, ambientales y médicos antes mencionados, existen evidencias claras de que en la DMAE están implicados factores genéticos. Los estudios iniciales con gemelos mono y dizigóticos, así como los de agregación familiar, mostraron que la DMAE es un trastorno hereditario para cuyo desarrollo se requiere una predisposición genética⁸⁶⁻⁸⁹. Sin embargo, el estudio de los determinantes genéticos de la patología se ha desarrollado lentamente. En primer lugar, la DMAE se manifiesta a edades relativamente avanzadas, por lo que habitualmente los padres de los pacientes han fallecido y los hijos son demasiado jóvenes para tener síntomas de la enfermedad. Esto limita la investigación clínica a una generación, de forma que los árboles familiares bien definidos son raros y el diseño e interpretación de los estudios genéticos familiares resulta complicado. Por otra parte, la DMAE no es un trastorno monogénico sino que, como se expone en la sección 1.6, en su etiología están implicados múltiples genes con efecto variable.

1.5.- CIRUGÍA DE CATARATAS COMO FACTOR PREDISPONENTE PARA LA DMAE

La cirugía de cataratas se ha considerado como un factor de riesgo para desarrollar DMAE avanzada, particularmente en aquellos pacientes que presentan DMAE temprana. La asociación entre cirugía de cataratas y DMAE neovascular se sugirió a partir de los resultados de un estudio histopatológico post-mortem transversal. Van der Schaft *et al.*⁹⁰ observaron que la formación de cicatriz disciforme secundaria a DMAE era más frecuente en ojos pseudofáquicos en comparación con ojos fáquicos de la misma edad. Estudios clínicos posteriores demostraron que la cirugía de cataratas aumentaba el riesgo de progresión a DMAE neovascular en pacientes con DMAE incipiente. Pollack *et al.*⁹¹ siguieron a 47 sujetos con DMAE bilateral simétrica moderada no neovascular que fueron sometidos a cirugía de

cataratas en un solo ojo. La progresión a DMAE neovascular al cabo de un año era mas alta en los ojos operados (19%) que en los controles (4.3%). Los mismos autores observaron que la incidencia de DMAE neovascular en el segundo ojo después de cirugía de cataratas era incluso mayor y no se correlacionaba con el curso post-operatorio del primer ojo ⁹².

Por la importancia del tema, numerosos estudios epidemiológicos han investigado el impacto de la cirugía de cataratas sobre el riesgo de desarrollar DMAE avanzada. En el *Beaver Dam Eye Study* y el *Blue Mountains Eye Study* se encontró que la intervención se asociaba con una incidencia más alta de DMAE después de 5 y 10 años de seguimiento, así como con una progresión de DMAE incipiente hacia formas avanzadas. En concreto, el riesgo de desarrollar DMAE neovascular aumentaba 3-10 veces tras 5 y 10 años post-cirugía ⁹³⁻⁹⁵. Recientemente, se ha confirmado con los participantes en el *Beaver Dam Eye Study* esta asociación entre cirugía de cataratas e incidencia de DMAE avanzada tras veinte años de seguimiento ⁹⁶. Otros estudios en diversas poblaciones como el *Salisbury Eye Evaluation*, *Proyecto VER*, *Baltimore Eye Survey* ⁹⁷, *Copenhague* ⁹⁸, *Andhra Pradesh Eye Disease Study* ⁹⁹, *Rotterdam Eye Study* ¹⁰⁰ y *Los Angeles Latino Eye Study* ¹⁰¹ también han demostrado que la cirugía de cataratas aumenta el riesgo de DMAE avanzada.

Se ha propuesto que la cirugía de cataratas podría provocar efectos adversos tanto indirectos como directos. En teoría, la eliminación del cristalino dejaría a la retina más susceptible al daño inducido por la luz. Por ello, las lentes intraoculares capaces de filtrar la luz UV, se han reemplazado actualmente por lentes que absorben también la luz azul. Más importante, la propia cirugía podría tener un efecto directo sobre la progresión de la DMAE incipiente ya que el ojo afectado puede ser especialmente vulnerable al trauma quirúrgico al estar alterada la membrana de Bruch. La inflamación aguda o crónica causada por la operación podría actuar como un estímulo angiogénico adicional. Así, las quimioquinas proinflamatorias implicadas en el aumento de la permeabilidad vascular y formación de edema tienen también propiedades angiogénicas. Se ha descrito que en un 10-20% de los casos de cirugía de cataratas sin complicaciones se produce edema macular cistoide subclínico que posiblemente facilita la neovascularización coroidal ^{102, 103}. En apoyo de esta hipótesis, los antagonistas del VEGF usados como agentes terapéuticos para la DMAE neovascular, resultan también eficaces para el tratamiento del edema macular cistoide ¹⁰⁴.

A la vista de los resultados obtenidos en los grandes estudios epidemiológicos, se ha sugerido la conveniencia de que los oftalmólogos clínicos sean restrictivos a la hora de someter a cirugía de cataratas a personas con DMAE. Sin embargo, en la actualidad se discute que esta intervención incrementa realmente el riesgo de desarrollar DMAE avanzada. Los resultados de los estudios poblacionales *Visual Impairment Project* y *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS) indican que la cirugía de cataratas no aumenta el riesgo de progresión a DMAE^{105, 106}. En el 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 meses¹⁰⁷.

Algunos estudios clínicos realizados en los últimos años tampoco han encontrado una asociación significativa entre la cirugía de cataratas y el riesgo de progresión a DMAE neovascular¹⁰⁸⁻¹¹². El estudio de Hooper *et al.*¹¹² es particularmente interesante ya que muestra que incluso en pacientes con DMAE incipiente y alto riesgo de progresión, el procedimiento quirúrgico no acelera la evolución a DMAE neovascular, aunque el período de seguimiento fue sólo de 6 meses.

En conclusión, la información disponible acerca de la relación entre cirugía de cataratas y riesgo de progresión a DMAE avanzada es contradictoria por lo que no es posible extraer una conclusión definitiva. La comorbilidad de la DMAE y las cataratas en la población anciana es alta puesto que ambas patologías están estrechamente relacionadas con la edad. Esto plantea un serio interrogante a los oftalmólogos clínicos que han de valorar los potenciales beneficios y riesgos de la intervención en estos pacientes.

1.6.- GENÉTICA DE LA DMAE

1.6.1.- GENES CANDIDATOS

La predisposición genética a las enfermedades maculares ha sido objeto de estudio desde la última década del siglo pasado. Ahora está claramente establecido que existen factores genéticos que confieren susceptibilidad para la DMAE.

Se han empleado diversas estrategias para identificar las regiones genómicas implicadas en la patogénesis de la DMAE. Inicialmente se analizaron genes que eran funcionalmente relevantes en las distrofias maculares hereditarias, las cuales exhiben ciertas características comunes con la DMAE¹¹³, pero no se hallaron asociaciones significativas entre la mayoría de los genes estudiados y la DMAE⁸¹. Posteriormente se llevaron a cabo estudios de ligamiento clásicos que tampoco resultaron de mucha utilidad para identificar posibles genes implicados en el trastorno. El Proyecto Genoma Humano, finalizado en 2003, abrió nuevos horizontes para el entendimiento de las enfermedades complejas como la DMAE. Mediante los estudios de asociación del genoma completo (*genome-wide association studies*, GWAS) se ha demostrado consistentemente que dos *loci* en las regiones q32 del cromosoma 1 y q26 del cromosoma 10 (1q32 y 10q26, respectivamente) confieren el mayor riesgo genético para la DMAE¹¹⁴⁻¹¹⁸.

El Proyecto Genoma Humano también ha conducido a la producción del HapMap, una colección de millones de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en el DNA humano. A diferencia de las mutaciones, los SNPs se consideran como variaciones normales en la secuencia de los genes, presentes en más del 1% de la población general y que pueden proteger o predisponer a varios trastornos, entre las cuales se incluyen la DMAE y sus distintas formas. Gracias al HapMap y a las nuevas tecnologías, varios grupos independientes identificaron en 2005 un SNP, Y402H (rs1061170, T1277C), localizado en la región cromosómica 1q32 correspondiente al gen *CFH* (factor H del complemento, OMIM 134370) significativamente asociado con la DMAE, tanto en sus formas avanzadas como en las iniciales¹¹⁹⁻¹²¹. Desde entonces, esta asociación se ha confirmado en múltiples grupos étnicos, excepto en poblaciones asiáticas (japoneses, chinos y coreanos)^{81, 122-125}. Como se ha mencionado, la frecuencia del alelo 402H varía notablemente en distintas poblaciones, lo que se ha correlacionado con las diferencias observadas en la prevalencia de la DMAE entre distintos grupos étnicos. Así, la frecuencia del alelo de riesgo y también la prevalencia de DMAE avanzada son menores en poblaciones asiáticas que en poblaciones de origen europeo. Las poblaciones de origen africano constituyen una excepción puesto que la frecuencia del alelo de riesgo es similar a la de los europeos y sin embargo, la prevalencia de DMAE es considerablemente menor⁷⁹. Los estudios en poblaciones caucásicas han revelado que la variante alélica C incrementa el riesgo para DMAE por un factor de 2.1 a 4.6 en individuos

heterocigotos y por un factor de 3.3 a 7.4 en los homocigotos, resultados que fueron confirmados a través de un meta-análisis¹²⁶. Se ha estimado que este alelo puede contribuir al 50% de todos los casos de DMAE¹²⁷.

Además del SNP Y402H, se han identificado otros SNPs en el gen *CFH*, tanto en las regiones codificantes como no codificantes, que también contribuyen en mayor o menor grado a la susceptibilidad para DMAE, en especial las variantes no codificantes^{32, 81, 128, 129}. La importancia relativa de cada SNP depende del estudio particular y de la población estudiada³². Tres de estos polimorfismos, uno en el exón 11 del gen (rs2274700) y dos intrónicos (rs1410996 y rs7535263) forman parte, junto con el Y402H, del mismo haplotipo de riesgo para la DMAE (H1)¹³⁰. Actualmente se admite que el gen *CFH* desempeña un papel central en la patogénesis de la DMAE aunque aún no se conoce con precisión el mecanismo a través del cual las variantes del gen contribuyen al desarrollo de la patología.

El segundo locus más importante en cuanto a la susceptibilidad para DMAE, 10q26, fue identificado en el año 2000 por Weeks *et al.*¹³¹ y ha sido confirmado posteriormente en diversos estudios y meta-análisis^{32, 81, 132}. A diferencia del locus 1q32, que corresponde a un único gen (*CFH*), la región 10q26 comprende tres genes: *PLEKHA1* (*pleckstrin homology domain-containing protein, family A, member 1*, OMIM 607772), *ARMS2*, antes denominado *LOC 387715*, (*age-related macular degeneration susceptibility 2*, OMIM 611313) que codifica una proteína cuya función aún no ha sido establecida de forma inequívoca, y *HTRA1* (*high-temperature requirement factor A1*, OMIM 602194), que codifica una serina proteasa multifuncional inducible por estrés que participa en la degradación de la matriz extracelular^{133, 134}. El refinamiento de los estudios genéticos ha permitido concluir que la asociación entre esta región y la DMAE se debe a un segmento que comprende los genes *ARMS2/LOC 387715* y *HTRA1*¹³⁵⁻¹³⁸, lo que sugiere dos posibles genes candidatos. La asociación más significativa con la DMAE la generan los polimorfismos rs10490924 en el exón 1 del gen *ARMS2* y rs11200638 en el promotor del gen *HTRA1* (Figura 1.23).

Debido al fuerte desequilibrio de ligamiento que se observa en esta región, los estudios genéticos tienen una capacidad limitada para distinguir los efectos de uno y otro polimorfismo. Un meta-análisis realizado para investigar la relación del polimorfismo

para DMAE independientemente del gen *CFH*, aunque en este caso la asociación es con las formas avanzadas de la enfermedad^{123, 136, 141, 145-148}. Esta asociación también se ha confirmado en un análisis que recopila los resultados de tres estudios poblacionales: *National Eye Institutes* (NEI), *Age Related Eye Disease Study* (AREDS) y *Blue Mountains Eye Study* (BMES)¹⁴⁹. El riesgo es similar en poblaciones caucásicas y orientales⁸¹. Un importante meta-análisis ha confirmado la influencia de este polimorfismo y ha estimado que los homocigotos TT y los heterocigotos TG tienen un factor de riesgo para DMAE 7.5 y 2.4 veces mayor, respectivamente, que los homocigotos GG¹³⁹. Además, parece que los sujetos que poseen una o dos copias del alelo de riesgo tienen más predisposición a desarrollar DMAE en su forma neovascular¹⁵⁰. Los fumadores que portan esta variante tienen un riesgo 22 veces mayor que los no fumadores para desarrollar DMAE avanzada, especialmente la forma neovascular¹⁴⁶.

Más recientemente se ha identificado un nuevo polimorfismo deleción-inserción (*372_815del443ins54) localizado en la región 3'-UTR del gen *ARMS2* (véase Figura 1.23) que también está significativamente asociado con la DMAE^{145, 147}. Esta variante elimina la secuencia señal para poliadenilación existente en la posición *395_400, e inserta un elemento rico en AU de 54 pb que se sabe que favorece la inestabilidad y la rápida degradación de los ARNs mensajeros que codifican una amplia variedad de proteínas. Las consecuencias funcionales del polimorfismo del443ins54 no están claras ya que unos autores han descrito que los homocigotos para esta variante muestran niveles reducidos del mRNA¹⁴⁴ y no expresan la proteína *ARMS2* debido a la inestabilidad del mensajero¹⁴⁵, mientras que otros afirman que la variante no modifica los niveles de expresión del mRNA en la retina^{143, 148}. Es interesante mencionar que los polimorfismos A69S y del443ins54 están en desequilibrio de ligamiento al 100% y residen en el mismo haplotipo, por lo que los efectos de cada uno de ellos no son independientes³².

Un buen número de otros genes se han relacionado con la patogénesis de la DMAE, aunque su asociación con la enfermedad no ha sido confirmada de forma consistente, o bien su contribución es pequeña^{81, 123, 151}. Entre ellos se pueden citar los genes: *ABCR/ABCA4* (*ATP-binding cassette, subfamily A, member 4*); *HMCN1* (hemicentina); *TLR3* (*Toll-like receptor 3*); *TLR4* (*Toll-like receptor 4*); *VEGF-A* (*vascular endothelial growth factor A*); *CX3CR1* (*chemokine CX3C motif receptor 1*); *ERCC6* (*excision-repair cross-complementing group 6*); *FBLN5* (fibulina

5); *APOE* (apolipoproteína E); *CETP* (*cholesteryl ester transfer protein*); *TIMP3* (*tissue inhibitor of metalloproteinase 3*); *LIPC* (lipasa hepática); *COL10A1* (*collagen type X, alpha 1*); *COL8A1* (*collagen, type VIII, alpha 1*); *FRK* (*fyn-related kinase*). De particular importancia es la identificación de otros SNPs en genes que codifican distintos componentes del sistema del complemento (*C2*, *CFB*, *C3*, *CFI* y *CFHR1*) que muestran asociación con la DMAE aunque más débil que las variantes del gen *CFH*^{152, 130}. Esto refuerza la idea de que el sistema de complemento puede jugar un papel importante en la patogénesis de la DMAE.

La conclusión que se extrae de todos los estudios realizados hasta la fecha es que los genes *CFH* y *ARMS2* son los principales determinantes de la susceptibilidad genética para la DMAE. De hecho, los efectos de las variantes de riesgo son muy superiores a los de otros genes que confieren susceptibilidad para una variedad de trastornos complejos tales como diabetes tipo 2, cáncer de mama o Parkinson¹²⁴. En los individuos homocigotos para los alelos de riesgo de ambos genes, este factor aumenta 50 veces, por lo que la presencia de estas variantes da cuenta de la mayoría de casos de DMAE¹⁵³. A continuación se exponen brevemente los conocimientos actuales acerca de la relación entre las variantes de riesgo de los genes *CFH* y *ARMS2* y la patogénesis de la DMAE.

1.6.2.- EL FACTOR H DEL COMPLEMENTO Y SU RELACIÓN CON LA PATOGÉNESIS DE LA DMAE

El sistema de complemento. Vías de activación

El factor H es un componente del sistema del complemento, un conjunto de 35-40 proteínas tanto plasmáticas como de membrana que interaccionan entre ellas y con otras proteínas del sistema inmunitario, constituyendo de esta forma el principal elemento de la respuesta inmunitaria innata y jugando un papel destacado en la adaptativa. El sistema del complemento es una de las partes más importantes del sistema inmunitario al desarrollar diversas funciones como opsonización y lisis de microorganismos, eliminación de partículas extrañas y células muertas, reclutamiento y activación de células inflamatorias, solubilización de inmunocomplejos y modulación de la respuesta mediada por anticuerpos.

Las proteínas del sistema del complemento se agrupan en 3 vías de activación denominadas: clásica, de las lectinas, y alternativa¹⁵⁴⁻¹⁵⁶, las cuales convergen en una ruta

final común cuya última etapa es la formación del complejo de ataque a la membrana (*membrane attack complex*, MAC) (Figura 1.24). Los estímulos que provocan la activación de estas vías son diferentes.

La ruta clásica (CP) se activa por la unión de la proteína del complemento C1q a los complejos antígeno-anticuerpo. En la vía de las lectinas (LP), el desencadenante es el reconocimiento y unión de los residuos de manosa presentes en los carbohidratos de las superficies de algunos patógenos por la lectina de unión a manosa, MBP, o por ficolinas. La ruta alternativa del complemento (AP) es la vía filogenéticamente más antigua, aunque recibe este nombre por haber sido descubierta más tarde que la clásica. Esta ruta se encuentra constitutivamente activa a un nivel basal bajo, su activación se exagera en caso de infección, y es la más importante en relación a la patogénesis de la DMAE. Más recientemente se ha descubierto un cuarto mecanismo de activación, la denominado vía intrínseca (IP), en la que proteasas del sistema de coagulación rompen directamente C3 o C5¹⁵⁷.

La etapa crítica en la activación del complemento es la formación de unos complejos multiproteicos inestables llamados C3-convertasas (C4bC2a en las vías clásica y de las lectinas, y C3bBb en la vía alternativa) que llevan a cabo la rotura proteolítica de C3 para generar la forma activa C3b. El C3b se une covalentemente a la superficie del patógeno, marcándolo para su destrucción e iniciando la respuesta inflamatoria. La eficacia de la cascada del complemento depende del bucle de amplificación que provoca la C3-convertasa de la vía alternativa: el C3b generado formará más convertasa C3bBb, la cual activará más C3 produciéndose una amplificación exponencial de la activación inicial sobre la superficie activadora¹⁵⁴. La unión de una molécula adicional de C3b a las C3-convertasas genera las C5-convertasas con capacidad para unirse y romper al componente C5. A partir de aquí, se van activando y depositando diversas proteínas sobre la superficie hasta la formación del MAC que provoca la lisis del patógeno mediante la formación de poros en la membrana. Los poros líticos tienen un tamaño de unos 100Å y pueden inducir apoptosis en células eucariotas. También son los causantes de la rotura de la membrana de los patógenos provocada por la entrada de agua a su través.

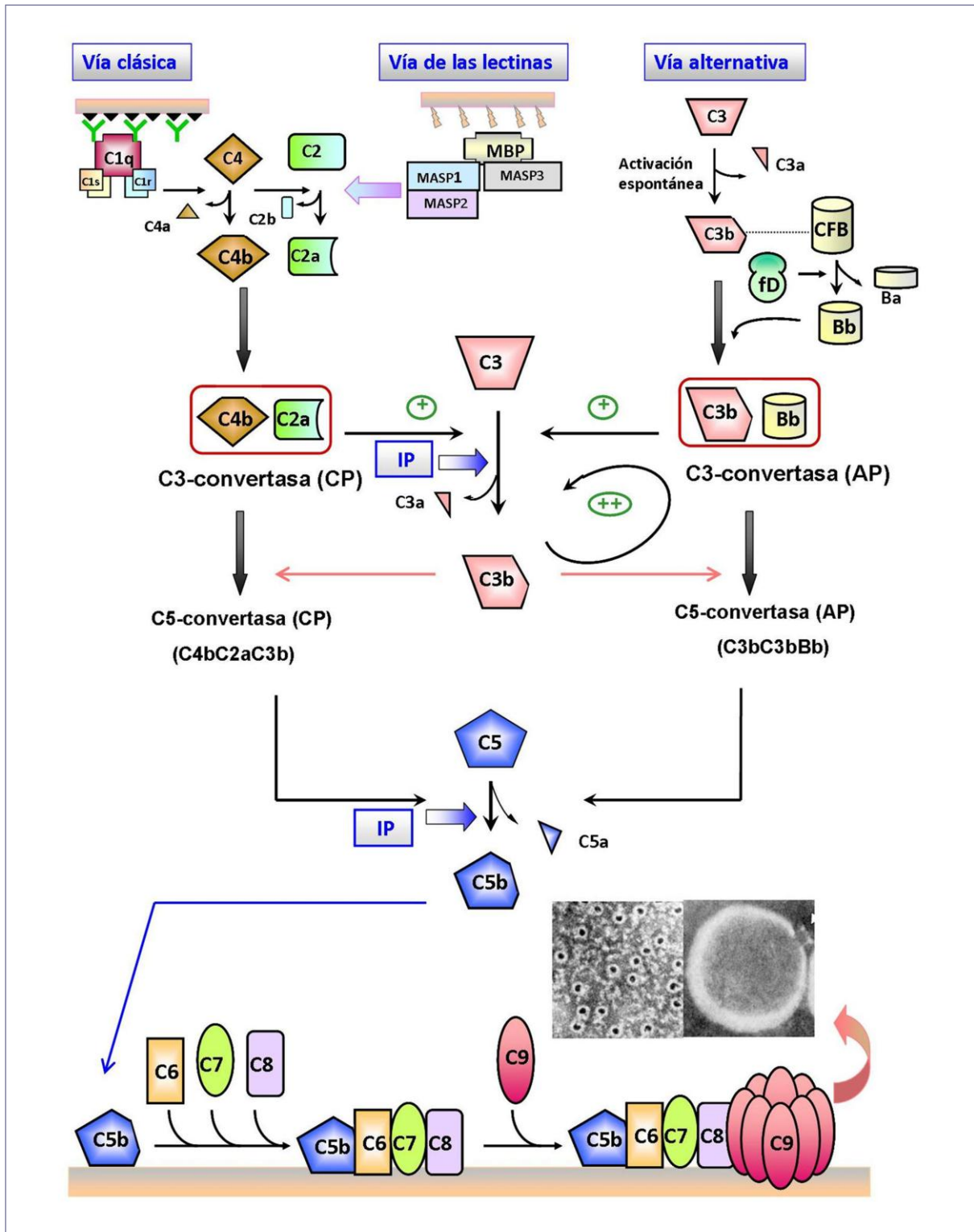


Figura 1.24.- Activación del complemento. En esta figura se muestran esquemáticamente las vías de activación del complemento. Todas ellas desencadenan la formación de sus respectivas C3 y C5-convertasas y convergen en la etapa final, el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana (MAC) que provoca la lisis celular. IP, vía intrínseca.

La acción del complemento puede tener lugar exclusivamente a través de la vía alternativa ya que como se ha mencionado, esta ruta se encuentra en un estado continuo de activación caracterizado por un bajo nivel de hidrólisis espontánea de C3, lo que genera los fragmentos C3a y C3b. La unión de C3b al factor B del complemento (CFB) permite al factor D escindir dicho factor B en dos fragmentos: Ba, que se libera, y Bb, que permanece unido formándose la C3-convertasa activa (C3bBb). Esta convertasa activará a más moléculas de C3, con lo que se inicia el bucle de amplificación que conducirá finalmente a la lisis celular.

Regulación del complemento por el factor H

La activación incontrolada de la vía alternativa es potencialmente peligrosa ya que podría provocar daño a las células propias del organismo. Para evitarlo, existen mecanismos reguladores que limitan este proceso de forma selectiva. Si la forma activa de C3 se deposita en superficies propias, o permanece en el plasma, los reguladores del complemento inactivarán inmediatamente estas moléculas, evitando el daño tisular. Por el contrario, si su deposición ocurre en la superficie de patógenos, se formará la C3-convertasa de la AP sobre ellos, activándose la cascada que conducirá a la lisis del patógeno. Los mecanismos reguladores del complemento actúan por tanto muy eficientemente permitiendo que la activación de la vía alternativa se focalice en las superficies activadoras y evitando la deposición de sus componentes en células sanas del propio organismo y, en consecuencia, el daño tisular. Esto es especialmente importante en un órgano inmunológicamente privilegiado y tan sensible como el ojo.

Las proteínas reguladoras del complemento se encuentran tanto en el plasma como en las superficies celulares. Un regulador esencial de la vía alternativa es el factor H (CFH), una glicoproteína plasmática relativamente abundante que consta de una sola cadena polipeptídica (155 kDa) compuesta por 20 unidades repetitivas de 60 aminoácidos, denominadas dominios SCR (*short consensus repeats*) separadas por una pequeña región de 3-8 aminoácidos. Se sintetiza principalmente en el hígado y localmente, en el ojo y en otros tejidos en menor cantidad. En el ojo es sintetizado por las células del EPR y sobre todo por células residentes de la coroides quedando confinado en el EPR, membrana de Bruch y, fundamentalmente, en los capilares coroideos y columnas intercapilares^{31, 158}. La concentración de CFH en plasma varía notablemente en la población, presentando valores que

oscilan entre 116 y 750 $\mu\text{g/ml}$ ^{31, 159}. Esta variación es consecuencia de los efectos combinados de factores genéticos y ambientales. Así, se ha demostrado que los niveles plasmáticos aumentan con la edad y disminuyen con el tabaquismo¹⁶⁰. La acción reguladora del factor H va encaminada a evitar la activación en superficies propias y se produce a dos niveles (Figura 1.25):

- Compite con Bb por la unión a C3b y promueve la disociación de la C3-convertasa de la vía alternativa (*decay-accelerating activity*). Así se impide la generación de nuevo C3b.
- Actúa como cofactor en la inactivación proteolítica de C3b mediada por el factor I (*factor I-cofactor activity*). Con ello se inactiva el C3b existente.

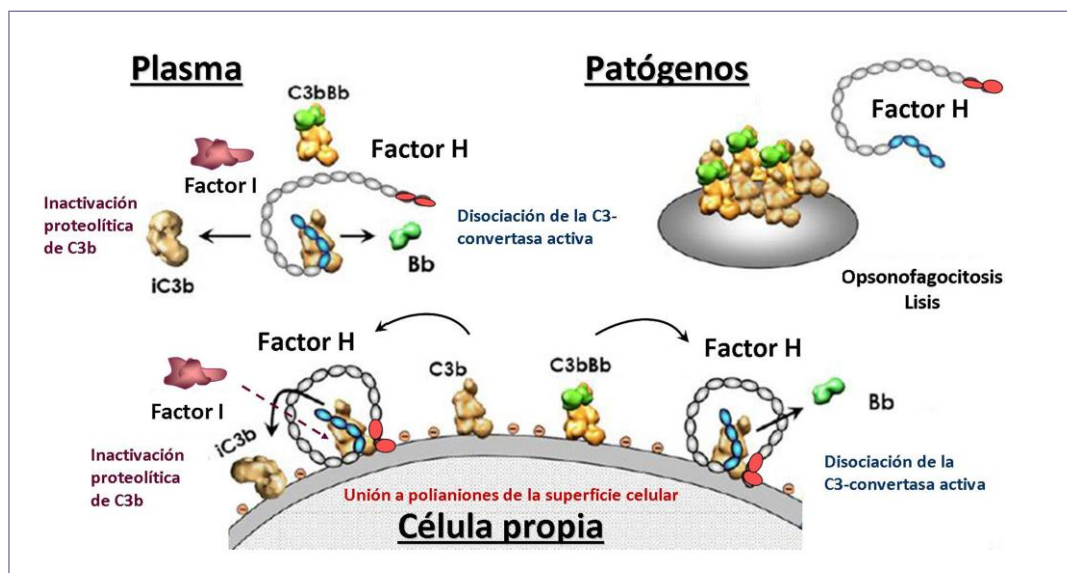


Figura 1.25.- Regulación de la vía alternativa del complemento en plasma y en superficies celulares por el factor H. El factor H discrimina entre células propias y patógenos mediante su unión a polianiones, los cuales están presentes sólo en las superficies de las células propias. El factor H actúa en dos formas: disocia las subunidades C3b y Bb en la C3-convertasa (*decay-accelerating activity*) y actúa como cofactor del factor I permitiendo la inactivación proteolítica de C3b (*cofactor activity*). Adaptada de Rodríguez de Córdoba *et al.* 2011¹⁵⁴.

El factor H es capaz de regular el complemento tanto en fases fluidas, como en superficies celulares. Mientras que la unión e inactivación de C3b en fases fluidas es muy rápida, la inactivación de C3b unido a membranas celulares es dependiente de la composición química de la superficie a la cual está unido. En presencia de polianiones tales como ácidos siálicos, o glicosaminoglicanos (GAGs, e.g. heparán sulfato, dermatán sulfato, heparina) la afinidad del factor H por C3b aumenta como consecuencia del reconocimiento simultáneo de

las moléculas polianiónicas y C3b por la misma molécula de factor H. Las membranas eucariotas son ricas en polianiones, de forma que el factor H se unirá a ellas evitando la activación de la vía alternativa del complemento que conduciría a daño celular. Sin embargo, las membranas de los microorganismos carecen de estos componentes, por lo que no habrá nada que impida la activación del complemento sobre ellos y la lisis celular.

Se han identificado las regiones de la molécula del factor H que desempeñan un papel importante para la acción reguladora^{154, 155, 158, 161}. Estas regiones incluyen sitios para la unión de C3b, polianiones, proteína C reactiva y la proteína M6 presente en la superficie de algunas bacterias patógenas (Figura 1.26). El dominio N-terminal SCR 1-4 es esencial para su actividad reguladora. A través de esta región, el factor H se une a múltiples dominios de C3b causando la desestabilización de la C3-convertasa y, además, proporciona una plataforma para la unión del factor I que llevará a cabo la degradación proteolítica de C3b¹⁶². Otras dos regiones adicionales de interacción con C3b, SCR 12-14 y posiblemente 19-20, le ayudan a desarrollar su función. Los sitios de unión a polianiones de la superficie celular se localizan en los SCR 7, 13 y 19-20. En la unión a la proteína C reactiva está implicado el SCR 7 y probablemente las regiones SCR 8-11 y 16-20. La unión a la proteína M6 se efectúa a través de la región SCR 6-7.

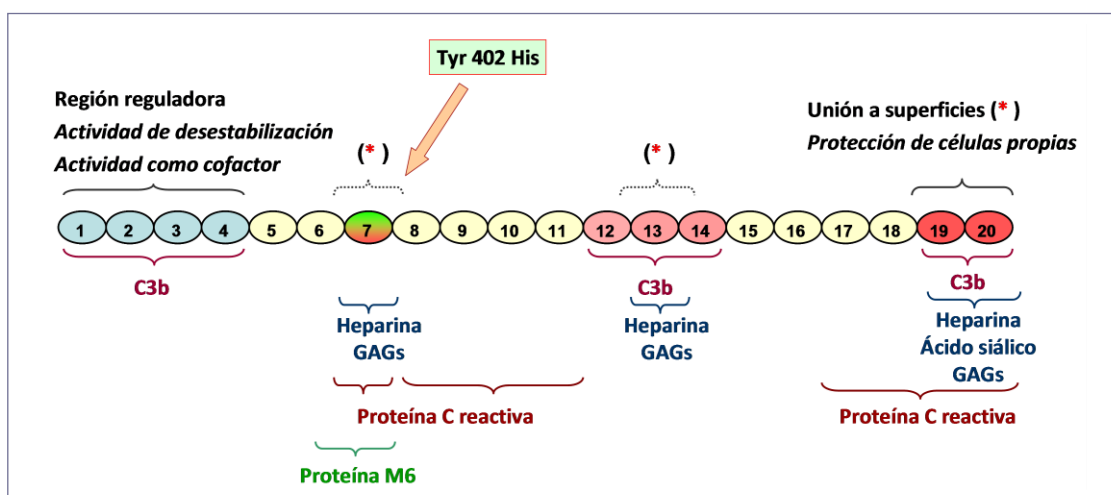


Figura 1.26.- Dominios funcionales en el factor H del complemento. El factor H consta de una sola cadena polipeptídica compuesta por 20 unidades repetitivas de 60 aminoácidos (SCR, *short consensus repeats*). Se muestran los sitios de unión para C3b, polianiones (heparina, glicosaminoglicanos, ácido siálico), proteína C reactiva y proteína M6 de la superficie de ciertas bacterias patógenas. El residuo polimórfico Tyr402His se encuentra en el SCR 7. El esquema está basado en datos publicados por: Rodríguez de Córdoba *et al.* 2011¹⁵⁴, Carroll y Sim, 2011¹⁵⁵, Clark *et al* 2010¹⁵⁸ y Okemefuna *et al.* 2010¹⁶¹.

El polimorfismo Y402H del gen CFH y su relación con la patogénesis de la DMAE

A nivel genético, el gen del factor H (*CFH*) se localiza en el cromosoma 1q32-q32.1, en la región centromérica del cluster RCA (*Regulator of Complement Activation*), un conjunto de genes muy próximos en el genoma que codifican las proteínas reguladoras de la activación de las C3-convertasas. El gen *CFH* está compuesto de 23 exones; el primero de ellos codifica la región 5' del mRNA no traducida y los 18 aminoácidos N-terminales que forman el péptido señal. Los demás exones codifican cada uno para un SCR, excepto el SCR2 que está codificado por los exones 3 y 4. El exón 10 no contribuye al transcrito del factor H, sino que es específico de FHL-1 (*FHLike-1*), un producto alternativo de *splicing* del gen *CFH* producido por los 9 primeros exones de *CFH* más el décimo, que codifica los 4 aminoácidos del extremo C-terminal y la región 3'UTR¹⁵⁹.

Distintas mutaciones y polimorfismos en el gen *CFH* se asocian con patologías diversas como el síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), la glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN) y, como ya se ha mencionado, la DMAE. En concreto, el polimorfismo de riesgo para la DMAE, T1277C en la posición rs1061170, se localiza en el exón 9 del gen *CFH*. El residuo polimórfico Tyr402His se encuentra en el SCR 7 del factor H, siendo uno de los que configuran los sitios de unión a polianiones de la superficie celular y a la proteína C reactiva (Figura 1.26). Mediante experimentos *in vitro*, se ha demostrado que el cambio Tyr/His en la variante de riesgo disminuye la afinidad de la unión del factor H a estas moléculas^{161, 163}.

De particular interés es que el SCR 7 es la región más importante para la interacción del factor H con los GAGs de la mácula humana, a diferencia de otros tejidos en los que este papel lo desempeña el dominio 19-20¹⁵⁸. En ojos de donantes se ha comprobado que el factor H se une al EPR, capilares coroideos y membrana de Bruch mediante la interacción con los GAGs dermatán sulfato y heparán sulfato. El polimorfismo Y402H afecta sólo a la unión con la membrana de Bruch, de forma que la variante polimórfica 402H se une menos que la forma 402Y¹⁵⁸. En base a estos resultados se ha propuesto que la regulación defectuosa de la ruta alternativa del complemento en esta localización puede ser un factor determinante en el inicio y progresión de la DMAE: la sobreactivación del complemento provocaría la inflamación local

crónica en la interfase EPR/coroides, el ataque mantenido a estas estructuras por MAC y, finalmente, la degeneración de los fotorreceptores. De hecho numerosas proteínas del complemento, incluyendo el factor H y el MAC, son componentes característicos de las drusas^{31, 164}. La razón de que el trastorno se manifieste a edades avanzadas probablemente sea debida a las alteraciones en la composición de GAGs que ocurren con el envejecimiento^{18, 165} que podrían afectar más profundamente a la unión de la variante de riesgo del factor H a la membrana de Bruch.

Por otra parte, el polimorfismo Tyr402His también afecta negativamente a la unión del factor H a la proteína C reactiva (PCR), aunque algunos autores han sugerido que el efecto observado es un artefacto derivado de las condiciones experimentales¹⁶⁶. La proteína C reactiva es una proteína de fase aguda cuya concentración aumenta a causa de infecciones y durante episodios de inflamación y/o daño tisular, que podrían tener lugar localmente en el ojo o bien en sitios distantes. La formación del complejo factor H-PCR, que ocurre en estas condiciones, bloquea la cascada del complemento, reduce la inflamación y favorece la fagocitosis no inflamatoria del tejido dañado. Si la variante 402H se une deficientemente a la PCR, los efectos supresores de la inflamación serían menos efectivos. Probablemente, la alteración en la formación del complejo factor H-PCR sea la causa de que los homocigotos para la variante de riesgo presentan niveles elevados de PCR en la retina y en los depósitos de drusas¹⁶¹.

Todas estas investigaciones han permitido establecer el importante papel del complemento en relación con la patogénesis de la DMAE. En particular, la disfunción del factor H en la regulación de la vía alternativa explica los resultados de los estudios genéticos que muestran que el alelo 402H es un importante factor de riesgo para esta patología. En la Figura 1.27 se muestra esquemáticamente el modelo propuesto actualmente para explicar la patogénesis de la DMAE.

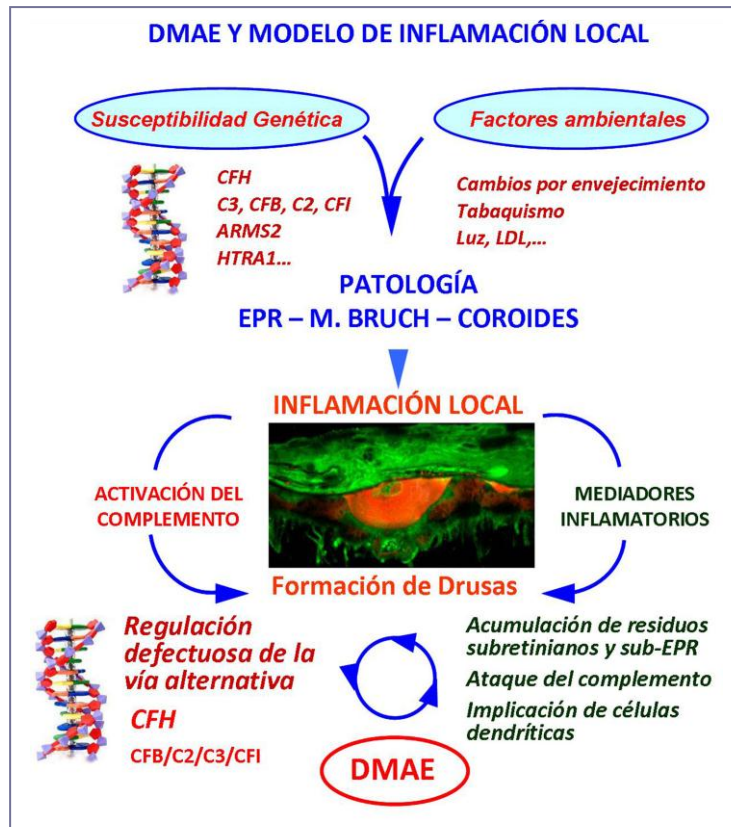


Figura 1.27.- Modelo de la inflamación local en la patogénesis de la DMAE. Uno o más factores ambientales de riesgo desencadenan la DMAE en individuos que presentan susceptibilidad genética (variantes en el gen *CFH* y/o *CFB/C2/C3/CFI*). La confluencia de los factores de riesgo ambientales y genéticos ocasiona a edades avanzadas cambios patológicos en el complejo EPR/membrana de Bruch/coroides y una respuesta inflamatoria local que incluye activación del complemento y otros eventos inflamatorios caracterizados por la formación de drusas y acumulación de otros depósitos sub-EPR, lisis celular e implicación de células dendríticas. Con el tiempo, se produce degeneración de fotorreceptores y la pérdida de visión central que define a la DMAE como entidad clínica. Adaptada de Anderson *et al.* 2010³¹.

1.6.3.- RELACIÓN DEL GEN *LOC387715/ARMS2* CON LA DMAE

El gen *LOC387715/ARMS2*, localizado en el cromosoma 10q26.13, se ha postulado como el segundo gen con mayor asociación a la DMAE, especialmente en las formas avanzadas de la enfermedad¹³⁶. Sin embargo, la caracterización biológica de este gen es muy limitada, y la función de la proteína producto, así como su relación con la patogénesis de la DMAE son cuestiones discutidas en la actualidad.

El gen se expresa en la retina y en una variedad de tejidos y líneas celulares. Contiene dos exones que codifican una proteína de 107 aminoácidos con una masa molecular de 12 kDa y 9 residuos susceptibles de fosforilación. Esta proteína no existe en otros mamíferos o

vertebrados, a excepción de los primates (chimpancés) que poseen una proteína ortóloga cuya secuencia está muy conservada (97%). Esto puede relacionarse con el hecho de que la DMAE sólo ocurre naturalmente en humanos y en estos animales. El alelo de riesgo, que contiene T en vez de G en el exón 1, provoca la sustitución de una alanina por una serina (A69S) en la proteína producto. Este cambio rompe la estructura en α -hélice de una región de la proteína y crea un nuevo sitio susceptible de fosforilación. Sin embargo, el polimorfismo no modifica los niveles de expresión y la estabilidad de la proteína, por lo que se ha sugerido que la variante de riesgo A69S puede presentar cambios conformacionales que perturben su función^{141, 148}.

Todavía no se conoce el mecanismo por el cual el cambio A69S podría influenciar la susceptibilidad para la DMAE. La proteína ARMS2 se localizó inicialmente en la región elipsoide de los fotorreceptores de la retina, donde se encuentran la mayoría de las mitocondrias¹⁴⁵. En células de mamífero transfectadas que sobreexpresan la proteína ARMS2, se detectó asociada a la membrana externa mitocondrial¹⁴¹. Sobre esta base, se ha propuesto que ARMS2 es una proteína mitocondrial relacionada con la homeostasis de este orgánulo, aunque no se ha determinado el mecanismo preciso de actuación. Como es sabido, la disfunción mitocondrial provoca la acumulación de mutaciones somáticas en el DNA mitocondrial y afecta a procesos esenciales como son el metabolismo energético, la generación de especies reactivas del oxígeno o la activación de rutas apoptóticas, lo que puede conducir a la muerte celular. Por ello se ha postulado que la sustitución A69S en la proteína ARMS2 podría alterar de alguna forma el funcionamiento mitocondrial y conducir a la degeneración de los fotorreceptores maculares¹⁴¹. Ciertas evidencias experimentales apoyarían esta hipótesis. Se ha demostrado que los niveles de biomarcadores de daño oxidativo están elevados en los ojos de donantes con DMAE en comparación con controles normales, lo que sugiere una mayor generación mitocondrial de especies reactivas del oxígeno^{29, 167, 168}. Hay que tener en cuenta que los fotorreceptores y el EPR son ricos en los ácidos grasos poliinsaturados docosahexanoico y eicosapentaenoico⁵⁴, muy susceptibles al daño oxidativo, y están expuestos a luz intensa y altos niveles de oxígeno (próximos a los arteriales), lo que supone un importante factor de riesgo. Por otra parte, se han detectado alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias (pérdida de crestas y reducción de la densidad electrónica de la matriz) y un drástico descenso del número de mitocondrias normales en los fotorreceptores y las células del EPR en retinas de pacientes con DMAE en

comparación con controles sanos de la misma edad³². Estos resultados avalarían la hipótesis de que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la DMAE.

Sin embargo, más recientemente se ha cuestionado esta teoría y se han propuesto otras funciones para la hipotética proteína ARMS2. Algunos autores describen que se localiza en el citosol de las células del EPR y que la variante A69S se asocia en parte al citoesqueleto¹⁶⁹. También se ha investigado mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión *in situ* de la proteína ARMS2 en ojos de donantes¹⁵³. Los resultados indican que se localiza preferentemente en las columnas intercapilares (Figura 1.28).

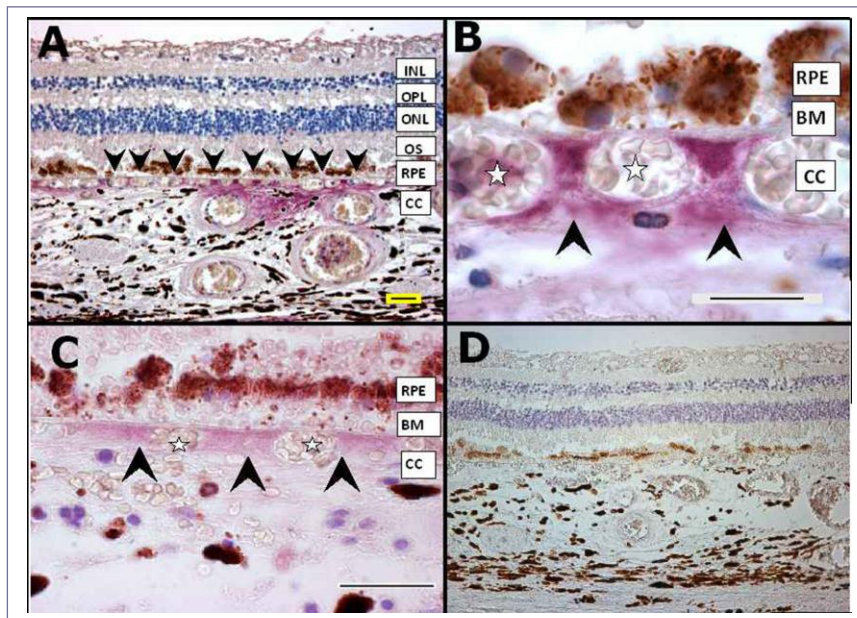


Figura 1.28.- Expresión de la proteína ARMS2 en el ojo humano. Los ojos de donantes se trataron con un anticuerpo monoclonal anti-ARMS2 y la detección se llevó a cabo con el sistema biotina-peroxidasa. (A) Imagen que muestra el enriquecimiento de ARMS2 en los pilares intercapilares (*flechas*). (B) Imagen a mayor aumento del marcateo de ARMS2 en estas estructuras. (C) Localización de fibulina-1 en la misma región. (D) Control negativo en el que se omite el anticuerpo primario. El símbolo ☆ indica el lumen de los capilares. Abreviaturas: INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa; OS, segmentos externos; RPE, epitelio pigmentario retiniano; BM, membrana de Bruch; CC: coriocapilar. Barra de escala, 20 µm. Tomada de Kortvely *et al.* 2010¹⁵³.

Frecuentemente se observa un gradiente de concentración de ARMS2, con la concentración más alta en la matriz adyacente a la membrana de Bruch. Sin embargo, sólo ocasionalmente se detectó un marcateo muy débil y difuso en el EPR y la retina. A nivel celular, ARMS2 se localiza en el retículo endoplásmico, no en la mitocondria, siendo posteriormente

secretada al espacio extracelular donde interacciona con una red de proteínas de la matriz extracelular, algunas de las cuales como las fibulinas están implicadas en la patogénesis de las distrofias maculares¹⁷⁰. En base a estos resultados, se ha propuesto que la proteína ARMS2 es un componente de la matriz extracelular cuya función fisiológica podría ser la protección contra la formación de drusas.

Otros autores describen que ARMS2 se expresa en el EPR en la retina humana, donde se localiza preferentemente en la región apical rica en microvilli y parece estar implicada en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores¹⁷¹. La razón de estas discrepancias no está clara pero podría deberse a las distintas aproximaciones metodológicas empleada en los distintos estudios. De este conjunto de datos, se puede concluir que no está clara cuál es la función de la proteína ARMS2 y en qué forma el polimorfismo A69S confiere el alto riesgo para la DMAE que se registra consistentemente en los estudios genéticos.

1.7.- PREVENCIÓN Y TRATAMIENTOS

Dado que no hay curación para la DMAE, el manejo clínico de la patología consiste en adoptar estrategias preventivas como primera aproximación. En cuanto a los tratamientos actualmente disponibles, son paliativos y van encaminados a retrasar o revertir la pérdida de visión causada en el estadio avanzado de la DMAE neovascular. Para la forma atrófica de la enfermedad, no se dispone todavía de ningún tratamiento establecido^{172, 173}.

1.7.1.- PREVENCIÓN

Las medidas preventivas consisten básicamente en la introducción de cambios en el estilo de vida, el empleo de suplementos nutricionales y la reducción de la exposición a la luz.

Cambios en el estilo de vida

Se ha estimado que el control de los factores de riesgo modificables tales como tabaquismo, hipertensión y obesidad podría reducir el riesgo de desarrollar DMAE a la mitad¹⁷⁴. En particular, el tabaquismo es un factor de riesgo importante, si bien se ha descrito que las personas que cesan de fumar, después de un período de 20 años, dejan de tener

riesgo incrementado de desarrollar DMAE ^{82,175}. En 2011 se publicaron los resultados del *Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study* (CAREDS), en el que han participado 1313 individuos de 55 a 74 años¹⁷⁶. Se demuestra que modificar el estilo de vida en términos de dieta saludable, no fumar y realización de actividad física, puede reducir tres veces el riesgo de desarrollar DMAE. Es novedosa la relación observada entre actividad física y DMAE. Es sabido que el ejercicio físico aumenta los niveles de enzimas antioxidantes¹⁷⁷ y disminuye los niveles plasmáticos de proteína C reactiva¹⁷⁸, de forma que se ha propuesto que el ejercicio físico podría contribuir a disminuir el estrés oxidativo y la inflamación, mejorando el estado de los pigmentos maculares.

Suplementos nutricionales

En la última década se han empleado como terapia preventiva los suplementos nutricionales y las dietas ricas en minerales y vitaminas. Respecto a los primeros, el estudio *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS), realizado con 3640 pacientes con DMAE, demostró que una combinación de zinc y antioxidantes reducía en un 25% el riesgo de progresión hacia DMAE avanzada, a lo largo de un período de seguimiento de 5 años, y disminuía un 19% el riesgo de pérdida visual ¹⁷⁹. Esta formulación no se recomendaba a los fumadores debido a que el β -caroteno incrementa el riesgo de cáncer de pulmón. En cuanto a las dietas ricas en minerales y vitaminas, los resultados del estudio *Rotterdam* mostraron que una ingestión media de vitaminas C y E, β -caroteno y zinc se asociaba con una reducción de la incidencia de DMAE del 35% ¹⁸⁰, por lo que se concluía que este tipo de dietas deberían ser recomendadas a individuos con signos incipientes de DMAE o a aquellos con antecedentes familiares.

Desde estos ensayos pioneros, se han realizado multitud de estudios cuyos resultados no han permitido alcanzar conclusiones definitivas respecto a la utilidad real de estas terapias preventivas. Una reciente revisión sistemática concluye que los suplementos nutricionales o vitamínicos, o las dietas ricas en estos elementos no son realmente eficaces para prevenir la DMAE o retrasar su inicio y alertan de los potenciales efectos adversos de la suplementación con altas dosis de vitaminas ¹⁸¹.

Otros compuestos que potencialmente podrían ofrecer protección contra la DMAE son las xantofilas luteína y zeaxantina. Estos pigmentos se encuentran en la mácula en altas

concentraciones y son los responsables de su color amarillento. *In vitro*, se ha demostrado que protegen a la retina del estrés oxidativo. Dado que los humanos no poseen la capacidad de sintetizar luteína, debe obtenerse a partir de la dieta; de ahí la propuesta de que la suplementación con este compuesto puede ofrecer protección contra la DMAE. Distintos estudios han arrojado resultados contradictorios sobre su efectividad^{85, 182, 183} por lo que en 2006 el National Eye Institute patrocinó el estudio AREDS-2, todavía en curso, para intentar resolver esta cuestión, reevaluar la fórmula del estudio AREDS y analizar los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 docosahexaenoico y eicosapentaenoico derivados de aceites de pescado y vegetales¹⁸⁴. Los potenciales beneficios de la antocianina, las vitaminas del grupo B y los extractos de arándanos y otras bayas (usados en la medicina tradicional china por sus propiedades protectoras del ojo) también están siendo objeto de estudio.

Reducción de la exposición a la luz

Como se ha mencionado, algunas investigaciones han sugerido que la exposición a la luz solar puede contribuir a la DMAE⁸⁵. En el *Beaver Dam Eye Study* (BDES) se midió la cantidad de exposición a la luz solar y la incidencia de DMAE en 2764 sujetos durante un período de seguimiento de 10 años¹⁸⁵. El BDES encontró que la exposición prolongada a la luz se asociaba con una mayor incidencia de la patología. Sin embargo, los efectos protectores de las gafas de sol eran sólo marginales.

Los estudios para analizar la incidencia de DMAE después de cirugía de cataratas e implantación de lentes intraoculares han proporcionado más evidencias acerca de la asociación entre la patología y la exposición a la luz. El cristalino humano se torna amarillo con la edad, de forma que protege a la retina de la fototoxicidad inducida por la luz ultravioleta y azul. Después de la extracción de las cataratas, la exposición a la luz azul es más alta que en cualquier otro momento de la vida⁹¹, por lo que la lente implantada debe mimetizar las propiedades del cristalino y ser capaz de filtrar el espectro de luz dañina (300-500 nm). Esto se consigue actualmente con las lentes intraoculares modernas conocidas como “lentes amarillas”.

1.7.2.- TRATAMIENTO DE LA DMAE NEOVASCULAR

Los tratamientos actuales son paliativos y van encaminados a retrasar o revertir la pérdida de visión causada en el estadio avanzado de la DMAE neovascular.

1.7.2.1.- Fotocoagulación con láser-argón

La fotocoagulación con láser-argón ha sido una de las terapias más comunes para el tratamiento de la DMAE neovascular. En la década de los 80, el *Macular Photocoagulation Study*¹⁸⁶ demostró que esta técnica reducía la pérdida de visión en pacientes que presentaban lesiones neovasculares extrafoveales, juxtafoveales y subfoveales bien definidas (clásicas). Sin embargo estas lesiones están presentes sólo en el 15-20% de los pacientes con DMAE exudativa y la tasa de recurrencia es alta (más del 50% de recidivas a los 12 meses). Además, el tratamiento puede provocar daño a la retina asociado con pérdida de visión permanente, por lo que en la actualidad se usa sólo ocasionalmente para tratar la neovascularización coroidea que se extiende a más de 200 μm desde el centro de la mácula⁵⁴.

1.7.2.2.- Terapia fotodinámica

En el año 2000, la FDA aprobó la terapia fotodinámica (TPD) con verteporfina para el tratamiento de la DMAE exudativa. La TPD es un tipo de tratamiento antiangiogénico en el cual se administra por vía intravenosa un derivado porfirínico sensible a la luz, la verteporfina, (*Visudyne, Novartis*) que es transportada en el torrente sanguíneo por las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El complejo LDL-verteporfina es captado por las células endoteliales de los vasos sanguíneos anormales de la coroides, que disponen de un gran número de receptores para LDL. Una vez que el fármaco se ha concentrado en las áreas dañadas, se excita con la luz de un láser rojo no térmico dirigido a la mácula, a una longitud de onda de 689 nm, correspondiente al máximo de absorción del agente fotosensibilizante. Una vez activada, la molécula de verteporfina inicia la generación de radicales libres que, mediante reacciones en cadena, lesionan el endotelio vascular causando efectos citotóxicos por rotura de membranas plasmáticas e intracelulares y daño a las mitocondrias. Estas lesiones provocan la liberación de factores vasoactivos y procoagulantes, lo que conduce a una trombosis con formación de agregados plaquetarios, trombos y oclusión vascular. El resultado final es la destrucción de los

nuevos vasos en el área de la neovascularización coroidea, mientras que las estructuras subyacentes de la retina se preservan.

En el estudio TAP se consiguieron resultados visuales con la TPD mejores que con el láser térmico y un 61% de los pacientes con neovascularización coroidal clásica logró estabilizar la visión frente a un 46% en el grupo control¹⁸⁷. Sin embargo, el uso de la TPD como monoterapia resulta menos eficaz que otros tratamientos y son pocos los pacientes que experimentan una mejoría. Además, un 3-4% de los pacientes sufren hemorragias submaculares y una severa pérdida de visión, aunque parte de esta pérdida es reversible. El uso repetido de la TPD parece ser seguro, con pocos efectos colaterales mínimos e infrecuentes como extravasación del fármaco en el sitio de inyección, dolor lumbar y reacciones de fotosensibilidad¹⁸⁸⁻¹⁸⁹. En 2002 y 2005 se publicaron guías para el empleo de esta terapia en pacientes con DMAE neovascular basadas en los resultados de ensayos clínicos y en la experiencia con poblaciones predominantemente caucásicas^{190, 191}.

1.7.2.3.- Técnicas quirúrgicas

Se han desarrollado diversas técnicas quirúrgicas vítreo-retinianas como la cirugía submacular y la translocación macular para tratar la DMAE. Aunque hoy en día son poco utilizadas, en algún caso pueden tener cierto interés para el manejo de complicaciones específicas de la patología¹⁹².

La extracción quirúrgica de las membranas neovasculares coroides tiene como objetivo mejorar la agudeza visual al reducir la destrucción macular debida a la proliferación de neovasos coroides. Sin embargo, se ha mostrado poco eficaz para evitar la pérdida de visión en pacientes afectados de DMAE en el *Submacular Surgery Trial*¹⁹³. Además, la intervención tiene un alto riesgo de desprendimiento del EPR y otras complicaciones por lo que ahora sólo es utilizada en situaciones muy concretas¹⁹⁴.

La translocación macular es otra estrategia para el tratamiento de la DMAE neovascular. Se han desarrollado distintas técnicas quirúrgicas que se dividen en dos tipos, extendidas y limitadas, dependiendo del tamaño de las retinotomías efectuadas. El objetivo de todas ellas es desplazar la mácula desde la zona de neovascularización subyacente, a una

nueva localización con células del EPR, membrana de Bruch y coriocapilares sanos con la esperanza de que una estructura subretiniana normal pueda permitir que los fotorreceptores maculares recuperen la función visual ¹⁹⁵. Aunque algunos estudios piloto demostraron potenciales beneficios de la translocación macular, existen importantes riesgos asociados como desprendimiento de retina, vitreorretinopatía proliferativa, desarrollo de membranas epirretinianas, edema macular, hemorragias coroideas y formación recurrente de neovascularización coroidal ¹⁹⁶.

También están recibiendo atención los trasplantes de EPR/coroideas que pueden ser una alternativa para pacientes que no pueden recibir o no responden a las terapias estándar. Aunque la técnica parece segura y el trasplante mantiene la función macular durante períodos prolongados, los resultados todavía no son satisfactorios en términos de ganancia de agudeza visual ^{197, 198}.

1.7.2.4.- Dispositivos intraoculares

La implantación de dispositivos intraoculares puede beneficiar a pacientes que no responden a terapias farmacológicas. Los telescopios miniaturizados implantables mejoran moderadamente la agudeza visual y la calidad de vida de los pacientes con pérdida de visión severa en las fases avanzadas de DMAE de acuerdo con los resultados de un reciente estudio que recoge los datos publicados en los últimos 12 años con más de mil pacientes ¹⁹⁹. La implantación quirúrgica de dispositivos estimulados eléctricamente en el nervio óptico, corticales, subretinianos y epirretinianos conduce a la percepción de fosfenos en humanos. Todos estos dispositivos pueden ayudar a restaurar la visión funcional en un futuro pero son muy primitivos en la actualidad ²⁰⁰.

1.7.2.5.- Terapia antiangiogénica intravítrea

Hoy día, la terapia antiangiogénica intravítrea es el tratamiento de elección para la DMAE neovascular. Una serie de ensayos clínicos y revisiones sistemáticas han establecido la eficacia de estas terapias y han concluido que la prognosis mejora con el uso clínico de agentes dirigidos contra el factor de crecimiento vascular endotelial VEGF. La terapia

antiangiogénica mantiene la visión en un alto porcentaje de pacientes afectados por DMAE exudativa y consigue mejoras sustanciales en un 25-40% de ellos¹⁷².

La emergencia de los anticuerpos anti-VEGF para el tratamiento de la DMAE revive la antigua tradición de la sueroterapia que fue aplicada con éxito en el siglo XIX para tratar afecciones oculares²⁰¹. La conjuntivitis diftérica era entonces un trastorno poco frecuente pero la infección era particularmente severa en niños y podía conducir a la pérdida del ojo. El agente infeccioso, el bacilo de Löffler-Klebs (*Corynebacterium diphtheriae*) y su toxina inducían una profusa exudación en la conjuntiva que tendía a coagular conduciendo a la necrosis de los tejidos infiltrados.

En 1894, Roux, Martin and Chaillou observaron que el suero antidiftérico, recientemente descubierto y utilizado para tratar la laringotraqueobronquitis resultaba eficaz para curar las manifestaciones oculares de la enfermedad. El oftalmólogo belga Henri Coppez fue el primero en emplear poco después las antitoxinas antidiftéricas para tratar la conjuntivitis diftérica en dos niños, concluyendo que los resultados clínicos eran espectaculares: *“Sous l’effet de l’injection, les fausses membranes semblent fondre comme un flocon de neige dans un rayon de soleil”*. Este nuevo tratamiento se extendió rápidamente por toda Europa y en 1895, el oftalmólogo francés Ernest Aubineau realizó el primer ensayo clínico con diez pacientes menores de 8 años. En todos los casos se produjo regresión a las 24-48 horas después del tratamiento. Este éxito motivó que Aubinay propusiera la sueroterapia antidiftérica como test diagnóstico de la difteria en las conjuntivitis infecciosas.

La sueroterapia para el tratamiento de las enfermedades oculares fue una terapia revolucionaria porque, a diferencia de los tratamientos tradicionales que eran aplicados localmente, las antitoxinas se administraban por vía sistémica (inyecciones subcutáneas o intramusculares). Los oftalmólogos no comprendían por qué se obtenía un efecto terapéutico lejos del sitio de inyección, ya que por entonces la naturaleza química de las toxinas era un misterio y no se sabía nada acerca de las inmunoglobulinas, su vida media y su distribución en el organismo. Además de ser un pionero de la sueroterapia en la oftalmología, Henri Coppez describió por primera vez en 1923, junto con Marcel Denis la degeneración macular exudativa senil.

La terapia antiangiogénica intravítrea que se lleva a cabo actualmente en la práctica clínica se puede considerar como una moderna forma de sueroterapia. Las inyecciones de agentes antiangiogénicos directamente en el vítreo evitan la administración sistémica y reducen la incidencia de efectos sistémicos adversos. Para estos procedimientos se utiliza una técnica aséptica y un anestésico tópico o subconjuntival (Figura 1.29). Aunque durante el curso de la enfermedad se administran frecuentes inyecciones intravítreas a los pacientes, no se suelen presentar eventos adversos serios. Respecto a las complicaciones locales, las inyecciones intravítreas pueden producir hemorragia subconjuntival, aumento de la presión intraocular, desprendimiento de retina, endoftalmitis bacteriana y uveítis. Más raramente se han observado desprendimientos de retina, hemorragia vítrea y anafilaxis¹⁷².

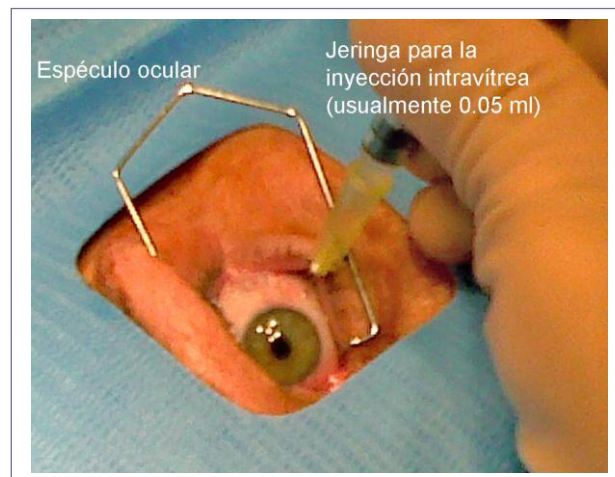


Figura 1.29.- Inyección intravítrea de agentes antiangiogénicos. La inyección de agentes antiangiogénicos directamente en el vítreo localiza la terapia en el ojo y minimiza los efectos adversos sistémicos. Típicamente se lleva a cabo de forma ambulatoria con el uso de un espéculo para mantener los párpados abiertos.

El primer agente intravítreo aprobado en 2004 por la FDA para la DMAE neovascular fue el **pegaptanib** sódico (*Macugen, OSI Pharmaceuticals*). Pertenece a una nueva clase de drogas terapéuticas llamadas aptámeros. Son nucleótidos sintéticos que adoptan una conformación tridimensional específica que les permite unirse con alta especificidad y afinidad a una amplia variedad de agentes terapéuticos. El pegaptanib es un aptámero pegilado. Se sintetiza a partir de un oligorribonucleótido (ARN) constituido por 28 bases, al cual se unen covalentemente dos unidades de 20 kDa de polietilenglicol con el fin de evitar su degradación por endo y exonucleasas endógenas e incrementar su vida media en la cavidad vítrea²⁰². Es un antagonista del VEGF-A, con afinidad hacia la isoforma 165 por lo que no interfiere con las

acciones fisiológicas de otras isoformas de la molécula. A pesar de los resultados esperanzadores obtenidos en el estudio *VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularisation (VISION)*²⁰³, el número de pacientes cuya agudeza visual mejora con pegaptanib es muy limitado. Por esta razón, así como por la introducción de los nuevos agentes antiangiogénicos de superior eficacia, el pegaptanib prácticamente no es utilizado en clínica en la actualidad.

Hoy día, las terapias más comunes para la DMAE neovascular son **bevacizumab** (*Avastin*, *Genentech*) y **ranibizumab** (*Lucentis*®, *Genentech*) intravítreos. Estos agentes antiangiogénicos son, respectivamente, un anticuerpo monoclonal completo y un fragmento derivado que han sido desarrollados mediante técnicas de biología molecular e ingeniería genética. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado específico que reconoce e inhibe a todas las isoformas del VEGF-A humano. Fue aprobado por la FDA en 2004 como un tratamiento intravenoso para ciertas formas avanzadas o metastásicas del cáncer colorrectal y de pulmón. Al tratarse de la molécula de anticuerpo completa, con un tamaño de 149 kDa, se pensó que no podría emplearse para el tratamiento de la DMAE ya que experimentos previos habían mostrado que el anticuerpo trastuzumab (Herceptin®) no era capaz de penetrar la retina cuando se inyectaba en el vítreo de modelos animales²⁰⁴. Posteriormente, los resultados de estudios preclínicos demostraron que el límite de exclusión de la retina humana y de otras especies examinadas era de 76 kDa, lo que sugería que los anticuerpos completos no podrían penetrar todas las capas de la retina²⁰⁵.

Esto condujo a Genentech a desarrollar un fragmento Fab humanizado derivado de un anticuerpo monoclonal de ratón, específico frente a todas las isoformas del VEGF-A y de alta afinidad: el ranibizumab (*Lucentis*®). Para conseguir una eficaz inhibición del VEGF por este fragmento monovalente, el Fab original se sometió a mutagénesis random y posterior selección del mutante Fab Y0317 con alta afinidad de unión (Figura 1.30 A). El ranibizumab difiere de la parte correspondiente del bevacizumab en seis aminoácidos: cinco en los dominios variables y uno en el dominio constante (extremo C terminal de la cadena pesada) (Figura 1.30 B). Su masa molecular es de 48.3 kDa, no está glicosilado y puede ser producido fácilmente en *E.coli*. Debido a su estructura, más simple que la del bevacizumab, y a su afinidad 100 veces mayor, se requieren menores concentraciones para neutralizar la misma

cantidad de VEGF ²⁰⁶. El ranibizumab fue aprobado por la FDA en Junio del 2006 para el tratamiento de todos los tipos de DMAE neovascular ²⁰⁷.

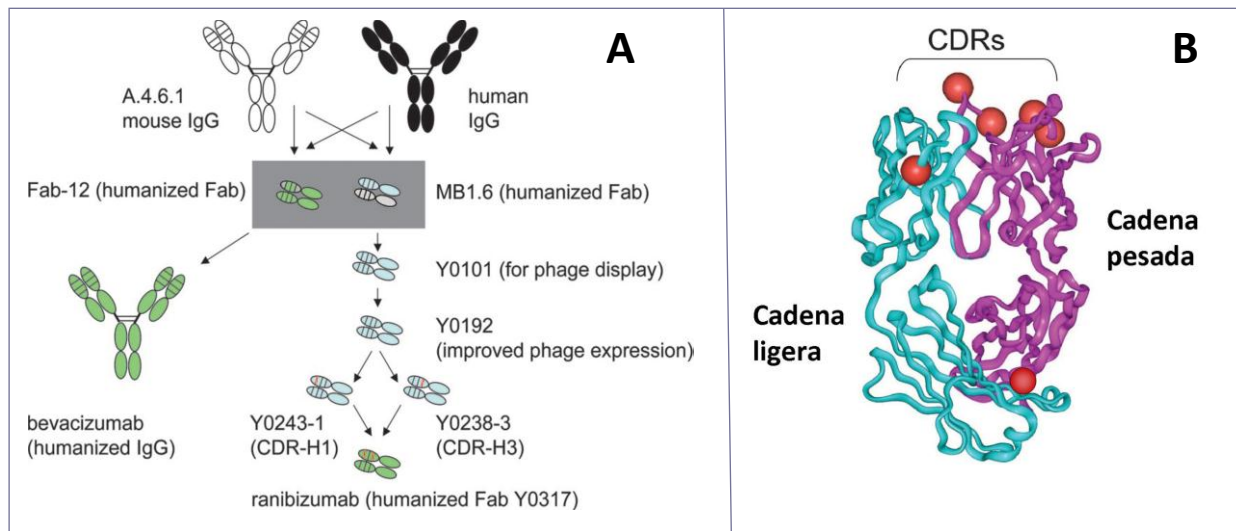


Figura 1.30.- Comparación de Ranibizumab y Bevacizumab. (A) Genealogía de los dos agentes: el esquema muestra los pasos en la elaboración de cada anticuerpo a partir del clon hibridoma de ratón A.4.6.1. Los diferentes colores de relleno indican distintas estructuras de los dos fragmentos originales humanizados de unión al antígeno (Fab) de los dos linajes. Cada flecha indica una o más etapas del proceso utilizado para crear los productos finales bevacizumab y ranibizumab. **(B) Estructura de ranibizumab:** las esferas rojas designan la posición de las sustituciones de aminoácidos en la molécula de ranibizumab en comparación con la correspondiente de bevacizumab. CDRs: regiones determinantes de complementariedad (bucles en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo implicados en la unión al antígeno). Tomado de Ferrara *et al.* 2006 ²⁰⁶.

A pesar de que bevacizumab no fue aprobado por ningún organismo regulador para su uso intraocular en humanos, comenzó su uso compasivo para tratar a pacientes con DMAE exudativa, comprobándose que mejoraban la agudeza visual. Ante las evidencias clínicas de su efectividad, se realizaron estudios adicionales con animales que permitieron comprobar que, en contra de lo que se creía, este particular anticuerpo sí es capaz de penetrar todas las capas de la retina, lo que explica su acción terapéutica ²⁰⁸. Así, de manera imprevista, la misma Compañía (Genentech) ha proporcionado dos agentes antiangiogénicos para el tratamiento de la DMAE neovascular.

A diferencia de lo que sucede con ranibizumab, cuya eficacia y seguridad están bien documentadas, los estudios sistemáticos acerca de bevacizumab han sido más escasos. La comparación de estas características es esencial ya que la diferencia de coste es notable: una dosis única inyectable de ranibizumab cuesta en España 954,45 euros, mientras que la de

bevacizumab asciende a 11,5 euros (1950 \$ frente a 30-75 \$ en EEUU). Recientemente se han publicado los resultados del *Comparison of AMD Treatments Trials (CATT): Lucentis®–Avastin Trial* ^{209, 210}, un ensayo multicéntrico con 1208 pacientes auspiciado por el National Eye Institute del NIH. A 12 y 24 meses, los efectos de bevacizumab y ranibizumab sobre la agudeza visual son equivalentes cuando la administración de los agentes se realiza de acuerdo al mismo protocolo. Otros ensayos clínicos también han descrito similar eficacia en términos de agudeza visual y espesor de la mácula ²¹¹. Sin embargo el perfil de eventos oculares y sistémicos adversos parece más favorable a ranibizumab, ya que bevacizumab se asocia con un mayor riesgo de inflamación intraocular y de tromboembolismos arteriales ²⁰⁹⁻²¹¹. Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios semejantes al CATT como: IVAN (Gran Bretaña), MANTA (Austria), VIBERA (Alemania), LUCAS (Noruega), GEFAL (Francia), EQUAL (Holanda) y FIG-DMAE (España).

Recientemente se ha introducido para el tratamiento de la DMAE neovascular **aflibercept** (*VEGF Trap-Eye, Eylea® Regeneron Pharmaceuticals Inc.*) Este nuevo antiangiogénico es una proteína de fusión que incorpora el segundo dominio del receptor 1 de VEGFR (VEGFR1) y el tercero del VEGFR2 al fragmento Fc de una IgG humana. La proteína quimera resultante es capaz de unirse con muy alta afinidad a todas las isoformas de VEGF-A y VEGF-B formando complejos inertes ¹⁷². Se han completado ya dos importantes ensayos clínicos con más de 1200 pacientes (VIEW 1 y VIEW 2) que demuestran que la eficacia de aflibercept es similar a la de ranibizumab pero se requieren menos inyecciones durante períodos de seguimiento de uno y dos años ²¹²⁻²¹³. La incidencia de eventos adversos es similar a la de bevacizumab y ranibizumab. A la vista de estos resultados, la FDA ha aprobado en Noviembre del 2011 el uso de este nuevo agente antiangiogénico en EEUU para el tratamiento de la DMAE exudativa.

1.7.2.6.- Radioterapia

La radioterapia es otra aproximación recientemente introducida para el tratamiento de la DMAE neovascular con el objetivo de que el paciente consiga mejoras visuales con efectos duraderos. Se basa en la capacidad que tiene la radiación ionizante para inactivar células de proliferación rápida como son las células del endotelio capilar de los neovasos coroideos y las

células inflamatorias. El tratamiento localizado con radioterapia tiene las potenciales ventajas de prevenir la proliferación del tejido vascular mediante la inhibición de la neoangiogénesis y de limitar la fibrosis cicatricial inhibiendo la proliferación de fibroblastos y el consiguiente depósito de colágeno. La radiación provoca daños en el ADN, interfiere en la síntesis de proteínas y evita la replicación. Aunque todas las células en el área irradiada resultan afectadas, el efecto de la radiación es selectivo ya que las células que no se dividen son capaces de reparar su DNA, mientras que las que se dividen rápidamente detienen el ciclo de división celular y sufren apoptosis²¹⁴. Se distinguen dos tipos de radioterapia en función del método de liberación de la radiación al tejido afectado: la teleterapia, que la proyecta al tejido desde una fuente externa, y la braquiterapia, en la que la fuente de radiación se aplica directamente a la zona lesionada tras un procedimiento quirúrgico²¹⁵.

Los estudios oftalmológicos iniciales utilizaron la radiación con una fuente externa para tratar la DMAE neovascular. Se empleó radiación de alta energía para penetrar el tejido ocular y periocular y alcanzar la mácula. Aunque en algunos casos se observaron resultados positivos en comparación con la evolución natural de la enfermedad, en general no se han demostrado claros beneficios²¹⁶⁻²¹⁷. Un factor que explica estos resultados es que con este procedimiento no es posible dirigir la radiación de forma selectiva hacia las lesiones maculares, que son de un tamaño mucho menor que las lesiones para las que habitualmente se aplica esta tecnología. En consecuencia, se produce daño colateral al tejido ocular. Además, dado que la radiación no produce sus efectos de manera inmediata, es posible que el trastorno progrese antes de que los efectos beneficiosos ocurran.

Actualmente se están investigando dos procedimientos distintos de radioterapia: la braquiterapia epimacular (*VIDION; NeoVista Inc. Fremont, EEUU*) y la radiocirugía estereotáxica (*IRay system; Oraya Therapeutics Inc. Newark, EEUU*) aplicadas como único tratamiento o en combinación con agentes anti-VEGF. En este último caso se pretende conseguir un efecto sinérgico aprovechando las características de ambas terapias: los agentes antiangiogénicos tienen un efecto rápido pero de duración limitada en muchos pacientes, mientras que la radioterapia produce una respuesta lenta aunque su acción es más duradera. Así, la combinación de ambos tratamientos puede incidir sobre la DMAE en dos formas distintas: inhibición local del VEGF por una parte, y eliminación de la población de

células inflamatorias e inducción de la apoptosis del endotelio vascular por otra. Potencialmente esto debería conducir a una recuperación más completa y duradera de la visión de los pacientes, reduciendo el número de retratamientos.

En la braquiterapia epimacular se utiliza radiación beta generada por una fuente de estroncio-90/ytrio-90. Mediante una vitrectomía *pars plana* se elimina el vítreo y se coloca el dispositivo generador de la radiación directamente sobre la lesión neovascular de la mácula previamente delimitada por angiografía fluoresceínica (Figura 1.31). Tras cuatro minutos de irradiación, se retira el dispositivo. Como la intensidad de la radiación beta disminuye en función de la distancia de la fuente, la dosis que reciben las estructuras vecinas es mínima. Así, la lesión macular recibe 24 gray (Gy), mientras que el nervio óptico y el cristalino reciben, respectivamente, 2.4 y 0.00056 Gy, niveles por debajo del umbral de seguridad para estas estructuras oculares²¹⁵.

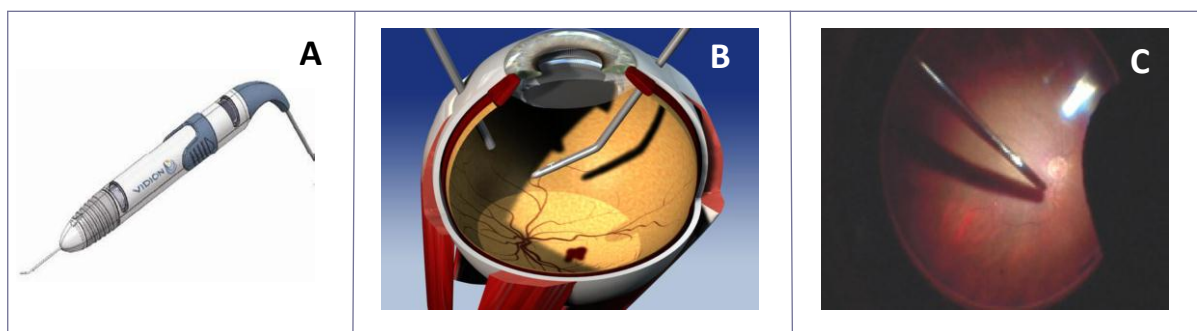


Figura 1.31. - Braquiterapia epimacular. (A) Dispositivo generador de radiación beta. El dispositivo se coloca en la mitad de la cavidad vítrea intraocular (B) previamente a su posicionamiento sobre la superficie de la retina (C).

Se han publicado los resultados de un estudio preliminar en el que un reducido número de pacientes (n = 34) afectados por neovascularización coroidea subfoveal fueron tratados con braquiterapia epimacular empleando el sistema VIDION y una dosis de 24 Gy. La braquiterapia se combinó con inyecciones intravítreas de bevacizumab, en el momento de la intervención, un mes después, y según la evolución atendiendo a criterios definidos para el retratamiento. A los 12 meses de la intervención, la agudeza visual se mantenía o mejoraba en un 68% de los pacientes con una ganancia media de +8.9 letras ETDRS. Sólo un 25% requirió terapia antiangiogénica adicional a las dos primeras inyecciones²¹⁸. Sin embargo, tras 24 y 36 meses de seguimiento, el cambio promedio de agudeza visual fue de -4.9 y +3.9 letras;

además al cabo de los 3 años, requirieron retratamiento con bevacizumab un 58% de los pacientes²¹⁹.

Los resultados del estudio MERITAGE, llevado a cabo con 53 pacientes que requerían frecuentes retratamientos con anti-VEGF, han mostrado que tras una sesión única de braquiterapia, un 81% de los participantes mantienen estable la visión al año. El cambio promedio en agudeza visual fue de -4 letras ETDRS y se requirieron una media de 3,49 retratamientos con ranibizumab²²⁰.

Los efectos adversos más comunes en ambos estudios han sido la formación de cataratas, hemorragias conjuntivales y vítreas, y dolor ocular. A la vista de los resultados, la conclusión provisional es que la relación beneficio/riesgo es moderada. Actualmente se están llevando a cabo estudios multicéntricos y multinacionales (*CABERNET* y *MERLOT*) para analizar la eficacia y seguridad de la técnica en poblaciones más amplias.

La radioterapia estereotáxica o radiocirugía es una modificación de la teleterapia convencional que permite dirigir la energía de la radiación sobre la lesión neovascular con gran precisión minimizando la exposición de los tejidos sanos contiguos. El procedimiento utiliza una fuente de radiación (rayos X de bajo voltaje en el *IRay*) y un dispositivo de liberación controlado robóticamente que se acopla al ojo del paciente mediante una lente de contacto adherida con succión y conectada a un sistema de vacío (Figura 1.32). El sistema libera 2 o 3 rayos con diferentes ángulos respecto a la diana terapéutica, los cuales penetran en el ojo a través de la región *pars plana* inferior de la esclera y convergen sobre la lesión de la fovea. De esta forma se reparte la dosis de entrada y se minimiza la exposición del cristalino y el nervio óptico. El sistema detecta continuamente cualquier movimiento del ojo e interrumpe el tratamiento si se produce un desplazamiento de la posición correcta mediante un dispositivo de seguridad^{215, 221}.

Los resultados de dos estudios preliminares indican que la aplicación combinada de radioterapia estereotáxica y tratamiento antiangiogénico mejora la agudeza visual de los pacientes en un promedio de 8-10 letras tras 6 y 12 meses de seguimiento. A los 6 meses, los pacientes requirieron un promedio de 0.5 inyecciones de ranibizumab^{215, 222}. En la actualidad

se están llevando a cabo los estudios multinacionales *CLH002* y *CLH003* para evaluar la eficacia y seguridad de esta terapia.

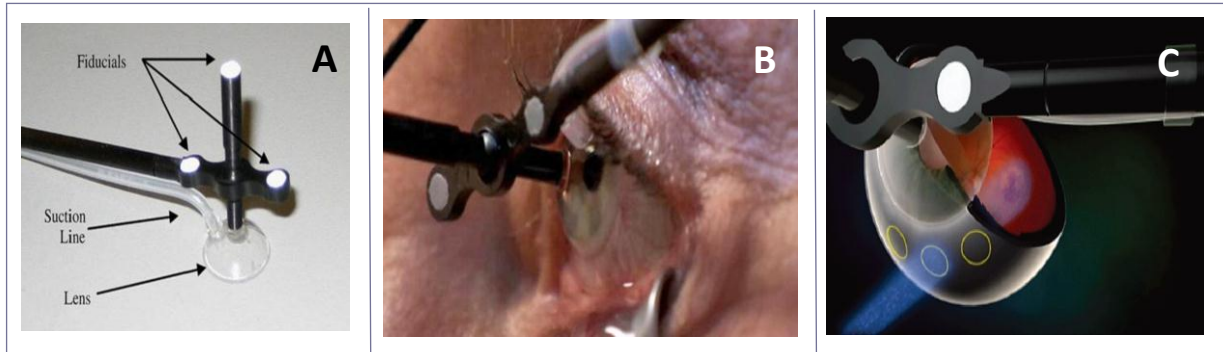


Figura 1.32.- Radioterapia estereotáxica. El sistema controlado robóticamente (A) se conecta al ojo del paciente mediante una lente de contacto (B). Ilustración que muestra la trayectoria de los rayos de radiación externa a través de la *pars plana* de la esclera y su convergencia sobre la mácula (C).

1.7.2.7.- Terapias combinadas

Las terapias que utilizan una combinación de agentes se están investigando con el objetivo de mejorar la eficacia y disminuir la frecuencia de los tratamientos requeridos. La base racional de estas terapias es la expectativa de que los distintos agentes empleados se dirijan contra los tres componentes, vascular, inflamatorio y proliferativo, que contribuyen a la neovascularización coroidea secundaria a DMAE exudativa. En diversos ensayos clínicos se han empleado terapias dobles que combinan: TPD con inyecciones intravítreas de acetónido de triamcinolona o dexametasona; TPD y administración intravítrea de anti-VEGF; antiinflamatorios no esteroideos y anti-VEGF. Más recientemente, las llamadas terapias triples combinan TPD, anti-VEGF y corticoides. La revisión del conjunto de los resultados obtenidos²²³ parece indicar que estas últimas resultan más efectivas para conseguir una eliminación sostenible de la NVC, mejorar o estabilizar la agudeza visual y disminuir la necesidad de retratamientos. En general, los ensayos se han realizado con un número reducido de pacientes y tiempos de seguimiento reducidos, por lo que no se pueden extraer conclusiones definitivas acerca de los beneficios y riesgos de este tipo de terapias, así como de las combinaciones y dosis más adecuadas.

1.7.2.8.- Terapias en desarrollo

En relación con la angiogénesis, se están estudiando otros agentes que actúan sobre distintos pasos de la cascada antiangiogénica. Las terapias en desarrollo incluyen: **bevasiranib** (*OPKO Health*), que es un RNA de interferencia (siRNA) diseñado para degradar el mRNA del VEGF; **vatalanib** (*Novartis A.G.*) y **pazopanib** (*GlaxoSmithKline*), inhibidores del receptor tirosina quinasa que interfieren la señalización por los receptores de VEGF-A; y **sirolimus** (rapamicina), que actúa sobre el factor de transcripción mTOR causando un descenso de la producción de VEGF y una reducción en la respuesta de las células endoteliales vasculares a la estimulación por VEGF¹⁷². La eficacia variable de estos agentes observada en los ensayos preclínicos puede reflejar especificidades de la forma en que bloquean la angiogénesis. Se requieren ensayos randomizados y bien controlados cuyos resultados justifiquen el uso de estas moléculas para tratar la DMAE en la práctica clínica.

Por otra parte, el conocimiento del importante papel que desempeña el complemento en la patogénesis de la DMAE ha estimulado el diseño de nuevos tratamientos que persiguen modular la activación incontrolada de la cascada del complemento. Varios compuestos se encuentran en fase 1 o fase 2 en ensayos clínicos (Figura 1.33): TA106 (*Taligen Therapeutics*) y eculizumab (*Soliris*[®], *Alexion Pharmaceuticals*) anticuerpos monoclonales anti-C3 y anti-C5, respectivamente; POT-4 (*Potentia Pharmaceuticals/Alcon*) un análogo del péptido cíclico sintético compstatina que actúa como inhibidor de C3; ARC1905 (*Ophthotech Corporation*), un aptámero anti-C5; y FCFD4514S (*Genentech/Roche*), un fragmento de un anticuerpo anti-factor D¹⁵².

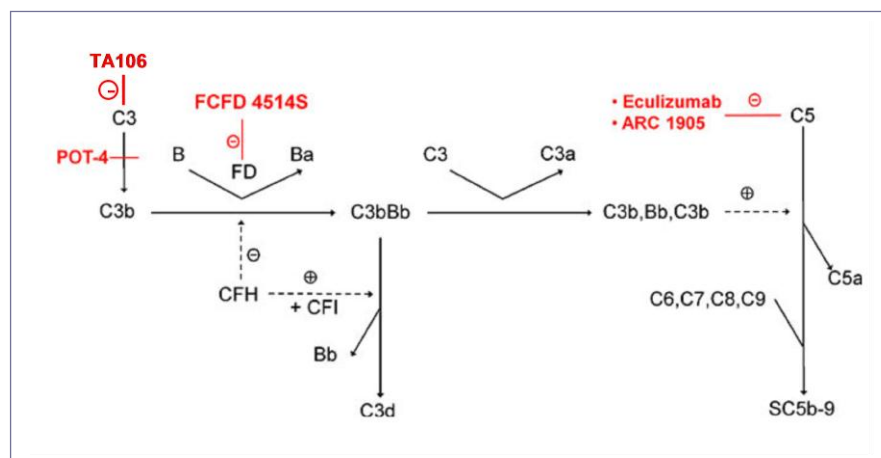


Figura 1.33.- Agentes terapéuticos actualmente en evaluación en ensayos clínicos. Las proteínas de la vía alternativa del complemento se muestran en negro y los agentes terapéuticos estudiados se representan en rojo.

En una fase preclínica se están investigando otros compuestos dirigidos a inhibir los efectos de las proteínas activadas del complemento o a normalizar una activación incrementada de la cascada del complemento.

1.8.- VALOR TERAPÉUTICO DE RANIBIZUMAB EN LA DMAE NEOVASCULAR

Las inyecciones intravítreas de ranibizumab son el protocolo estándar para el tratamiento de la DMAE neovascular desde su aprobación por la FDA en 2006 en base a los resultados favorables obtenidos en dos ensayos clínicos multicéntricos randomizados: MARINA (*Minimally classic/occult trial of the Anti-VEGF antibody Ranibizumab In the treatment of Neovascular AMD*) y ANCHOR (*Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD*).

En el estudio **MARINA** llevado a cabo con 716 pacientes durante 2 años, se comprobó que ranibizumab, inyectado mensualmente, no sólo prevenía la pérdida de visión sino que por primera vez, un tratamiento se asociaba con una mejoría de la visión en una importante proporción de pacientes con neovascularización coroidea oculta o mínimamente clásica. Los resultados eran realmente espectaculares. A los 12 meses, el 95% de los pacientes tratados con 0.5 y 0.3 mg de ranibizumab perdían menos de 15 letras ETDRS. Además, la agudeza visual mejoraba en 15 o más letras en un 34% de los pacientes tratados con 0.5 mg (25% en los tratados con 0.3 mg), mientras que en el grupo placebo este porcentaje era sólo de un 5%. Estos beneficios se mantenían a lo largo de 24 meses de seguimiento. Los incrementos medios en agudeza visual respecto a la línea base fueron de +7 letras en el grupo tratado con ranibizumab, mientras que en el grupo placebo el cambio medio fue de -10 letras. Por otra parte, los efectos adversos observados fueron endoftalmitis (1%) y uveítis (1%)⁶⁸.

El estudio **ANCHOR** se diseñó para comparar la eficacia de ranibizumab frente a la TPD. Los resultados mostraron claramente que las inyecciones mensuales de ranibizumab tenían una eficacia superior a la TPD con verteporfina para el tratamiento de la DMAE neovascular predominantemente clásica. El 94% de los pacientes que recibieron mensualmente 0.5 mg de ranibizumab y el 96% de los inyectados con 0.3 mg perdieron menos de 15 letras a los 12 meses, comparados con el 64% del grupo control tratado con TPD. Como en el MARINA, la

agudeza visual mejoraba en 15 o más letras ETDRS en un porcentaje significativo de pacientes tratados con el antiangiogénico: 36% para 0.3 mg y 40% para 0.5 mg. En comparación, esta ganancia sólo se observó en un 5.6% de los tratados con TPD. A los 12 meses, el cambio promedio en agudeza visual era de +8.5 y +11.3 letras en los grupos tratados con 0.3 y 0.5 mg de ranibizumab, respectivamente, y de -9.5 letras en el grupo control²²⁴. A los 24 meses de seguimiento, estos parámetros fueron +8.1, +10.7 y -9.8. Los cambios en las características anatómicas de la lesión, determinados por angiografía fluoresceínica, también fueron más favorables para ranibizumab. Sólo un 1.1% de los pacientes tratados con el antiangiogénico desarrolló endoftalmitis²²⁵.

Otros estudios han investigado la eficacia y seguridad de la terapia con ranibizumab con diferentes regímenes de administración. El estudio **PIER** (*A Study of rhuFAB V2 [Ranibizumab] in Subjects with Subfoveal Choroidal Neovascularization Secondary to Age-Related Macular Degeneration*) ha demostrado que la inyección mensual de 0.5 mg de ranibizumab durante 3 meses es superior al placebo para el tratamiento de la DMAE neovascular con lesiones predominantemente o mínimamente clásicas, u ocultas. Sin embargo, la ganancia de agudeza visual a los 3 meses (media de +4.7 letras) no se mantenía con la administración trimestral del agente, y a los 12 meses retornaba a los niveles de la línea base (media de -0.2 letras). En el mismo período, la pérdida de agudeza visual de los controles del estudio era de una media de -16.3 letras²²⁶. Por tanto, los resultados globales son menos favorables que los conseguidos en los estudios MARINA y ANCHOR con inyecciones intravítreas mensuales. En el estudio **EXCITE** (*Efficacy and Safety of Ranibizumab in Patients with Subfoveal Choroidal Neovascularization Secondary to Age-Related Macular Degeneration*) se ha demostrado claramente que la administración trimestral de ranibizumab proporciona peores resultados que la dosificación mensual para el tratamiento de todos los tipos de lesión neovascular²²⁷.

Estos resultados han planteado la importante cuestión de cómo conseguir los mayores beneficios en términos de ganancia visual y su mantenimiento, intentando a la vez reducir el número y/o frecuencia de las inyecciones para disminuir el riesgo de complicaciones y el coste del tratamiento. A diferencia de los estudios PIER y EXCITE, en los que se empleó un régimen variable con inyecciones de ranibizumab a intervalos fijos, otras investigaciones han utilizado un régimen a demanda (*pro re nata*, PRN) de acuerdo a diferentes protocolos y criterios para

el retratamiento. El estudio **PrONTO** (*Prospective Optical Coherence Tomography (OCT) Imaging of Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration (AMD) Treated with intraOcular Ranibizumab*), aunque con un número pequeño de pacientes (n = 40), ha arrojado resultados interesantes ya que demuestra que un régimen de tratamiento flexible guiado por OCT consigue resultados similares a los de MARINA y ANCHOR pero con menos inyecciones ²²⁸. El protocolo seguido consiste en 3 inyecciones mensuales consecutivas de 0.5 mg de ranibizumab y retratamientos si se observan alguno de los siguientes cambios en las visitas de seguimiento mensuales: pérdida de 5 letras y presencia de nuevo fluido en la mácula detectado por OCT, aumento del grosor retiniano central de al menos 100 micras (OCT), hemorragia macular, neovascularización coroidea clásica de nueva aparición, o fluido macular persistente en OCT un mes después de la inyección de ranibizumab. Tras 24 meses de seguimiento, la ganancia media de agudeza visual fue de +11.1 letras, para lo cual fueron necesarias una media de 9.9 inyecciones del agente antiangiogénico ²²⁹. Se ha estimado que la administración de ranibizumab en régimen PRN, con unos criterios semejantes a los del estudio PrONTO podría reducir en 6 veces la relación costo/efectividad-calidad de vida ²³⁰.

El estudio **SAILOR** (*A Study to Evaluate Ranibizumab in Subjects With Choroidal Neovascularization [CNV] Secondary to Age-Related Macular Degeneration*), un gran ensayo clínico con 4307 pacientes, ha evaluado la eficacia de un régimen variable de 12 meses consistente en 3 inyecciones mensuales de ranibizumab seguido de administración PRN hasta completar el período de investigación. Los criterios para el retratamiento en las visitas trimestrales incluían pérdida de agudeza visual de 5 o más letras o aumento del grosor retiniano central de 100 micras (medido por OCT) con fluido intrarretiniano o subretiniano. A los 12 meses, los pacientes tratados con 0.5 mg de ranibizumab ganaron una media de +2.3 letras ²³¹. Por tanto, los resultados globales fueron más desfavorables que en los ensayos MARINA y ANCHOR y también menos satisfactorios que en el PrONTO. El estudio **HORIZON** (*An Extension Study to Evaluate the Safety and Tolerability of Ranibizumab in Subjects with Choroidal Neovascularization Secondary to AMD or Macular Edema Secondary to RVO*) ha demostrado que la aplicación de un régimen variable PRN, según criterio del oftalmólogo, a pacientes que habían completado previamente los ensayos MARINA y ANCHOR conduce a una pérdida parcial de la agudeza visual conseguida con estos protocolos ²³².

En la Figura 1.34 se muestra una comparativa de la evolución de la agudeza visual a lo largo de 12 meses en pacientes que fueron tratados con 0.5 mg de ranibizumab de acuerdo con los diferentes protocolos mencionados.

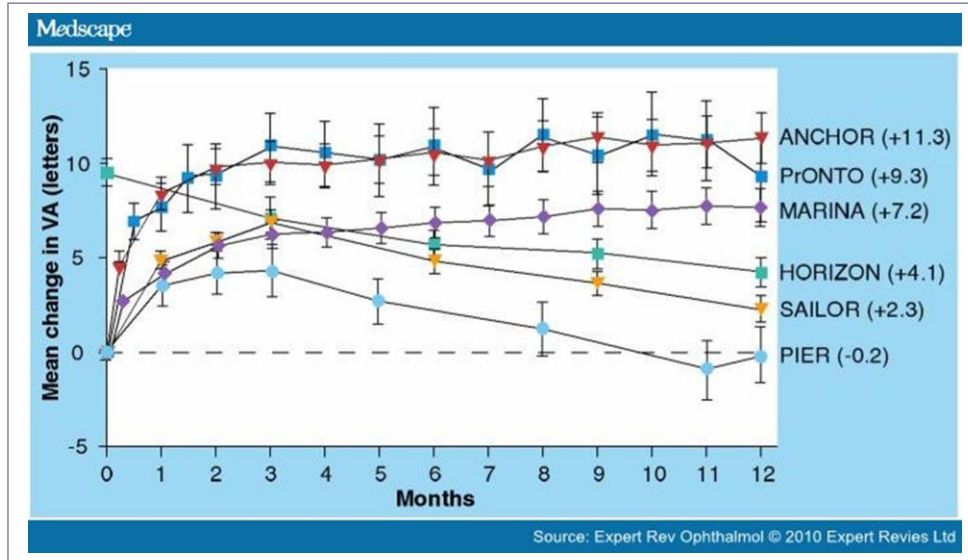


Figura 1.34.- Evolución de la agudeza visual con ranibizumab. Cambios en letras ETDRS (valores medios) a lo largo de 12 meses de seguimiento en pacientes tratados con 0.5 mg de ranibizumab en terapia mensual (estudios MARINA y PRONTO) y en regímenes variables (estudios PrONTO, HORIZON [cohorte tratada previamente], SAILOR y PIER).

En conjunto, estos estudios indican que el régimen flexible tiene eficacia terapéutica pero la ganancia de agudeza visual al final del período de seguimiento parece depender del protocolo de administración seguido. Por ello hay gran interés en la determinación de unos criterios precisos que permitan establecer un régimen de tratamiento idóneo con el menor número de inyecciones posibles y en la identificación de características morfológicas con valor predictivo de la respuesta a la terapia con ranibizumab.

En 2011 y 2012 se han publicado los datos de dos importantes ensayos multicéntricos llevados a cabo en Europa y EEUU, SUSTAIN y CATT, respectivamente. El estudio **SUSTAIN** (*Study of Ranibizumab in Patients With Subfoveal Choroidal Neovascularization Secondary to Age-Related Macular Degeneration*) ha incluido 513 pacientes a los cuales se les administraron 3 inyecciones mensuales de ranibizumab (0.3 mg) seguido de un régimen PRN con 0.5 mg del agente antiangiogénico durante 9 meses adicionales en función de criterios definidos para el retratamiento: pérdida de agudeza visual de 5 letras ETDRS y/o aumento de 100 micras del

grosor retiniano central determinado por OCT. Al cabo de 12 meses, la ganancia media de agudeza visual era de +3.9 letras con una media de 2,7 retratamientos²³³.

Los resultados del estudio **CATT** (*Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials*), con 1208 pacientes de 44 centros clínicos de EEUU, demuestran que la administración de ranibizumab en régimen PRN durante un período de 12 meses consigue los mismos efectos sobre la agudeza visual que un régimen mensual. La ganancia media en ambos casos era de +6.4 y +7.2 letras ETDRS, respectivamente, y la media de retratamientos de 7 inyecciones²⁰⁹. Sin embargo, a los 24 meses se observa una diferencia de 2,4 letras a favor del régimen mensual²¹⁰. El protocolo seguido incluye revisiones mensuales y considera que los retratamientos deben aplicarse si hay evidencia de lesión activa: fluido visualizado con OCT, hemorragia nueva o persistente, descenso de agudeza visual, o liberación de colorante o aumento del tamaño de la lesión determinado con angiografía fluoresceínica.

Otra estrategia es la denominada “*Treat and Extend*”²³⁴ (TER) o “*Inject and Extend*”, en la cual los intervalos de retratamiento se van incrementando secuencialmente en 2 semanas hasta la recurrencia de los signos de exudación. El intervalo se individualiza para cada paciente en función de su respuesta. Se ha descrito que con este régimen, los pacientes experimentan una mejora significativa de la agudeza visual al final del período de seguimiento²³⁵⁻²³⁷. Adicionalmente, el TER se asocia con un número menor de visitas del paciente e inyecciones, y una reducción de costes médicos directos en comparación con los protocolos mensuales²³⁵. También parece favorable la comparación del TER con el régimen PRN en cuanto a ganancia de agudeza visual tras 52 semanas de seguimiento (+10.8 vs +2.3 letras ETDRS), aunque se requieren más inyecciones (7.8 vs 5.2) y similar número de visitas²³⁷. En todo caso, el número de participantes en estos estudios no es tan elevado como en los grandes ensayos multicéntricos por lo que las conclusiones no pueden considerarse definitivas.

Conviene señalar que el criterio de retratamiento basado en la pérdida de agudeza visual (5 o más letras ETDRS) está cediendo protagonismo en favor del que prioriza la aparición de signos de lesión activa determinada en función de cambios morfológicos de las estructuras retinianas. Se ha sugerido que el concepto funcional de retratamiento supone un riesgo severo para la función visual porque las recurrencias que implican pérdidas visuales

agudas pueden estar asociadas a daño progresivo e irreversible de los fotorreceptores que no se eliminará aunque la actividad de la lesión se suprima de nuevo con el retratamiento anti-VEGF²³⁸. En consecuencia, el retratamiento debería preceder siempre a la pérdida de agudeza visual. En este sentido, el empleo de la OCT de dominio temporal ha sido de gran ayuda para la observación de ciertas alteraciones, pero la OCT de dominio espectral, técnica con mayor resolución, puede permitir una evaluación más precisa de los cambios morfológicos y un mejor seguimiento de los pacientes.

Respecto a la seguridad de los tratamientos con múltiples inyecciones intravítreas de ranibizumab, se ha demostrado que es bien tolerado y con una baja incidencia de eventos adversos importantes, al menos en períodos de 2 años. En cuanto a las complicaciones locales, puede generar inflamación intraocular, hemorragia conjuntival, incremento transitorio de la presión intraocular, hemorragia vítrea, desprendimientos retinianos, endoftalmitis bacteriana y uveítis, aunque la frecuencia de estas complicaciones es baja^{172, 233, 239}. Está contraindicado en pacientes con infecciones oculares o perioculares y en aquellos con hipersensibilidad al agente o a los excipientes. Los resultados de estudios recientes muestran que ranibizumab también parece exhibir un perfil de eventos oculares y sistémicos más favorable que bevacizumab²⁰⁹⁻²¹¹.

1.9.- FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIANGIOGÉNICO

Las inyecciones intravítreas de ranibizumab han revolucionado en los últimos años la terapia de la DMAE neovascular. A la vista de los resultados obtenidos en distintos ensayos clínicos, parece haber consenso en la necesidad de aplicar inyecciones mensuales durante los tres primeros meses de tratamiento (dosis de carga) para conseguir mejoras de la agudeza visual durante este período, aunque el régimen a seguir posteriormente es una cuestión debatida. Sin embargo, no todos los pacientes responden a la terapia con el anti-VEGF ya que las ganancias de agudeza visual descritas en los estudios reflejan valores medios.

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 que varían en la

población: edad de presentación, dieta y factores ambientales, tipo y tamaño de las lesiones neovasculares, estímulos para la expresión del VEGF y/o factores angiogénicos y antiangiogénicos adicionales, y factores genéticos²⁴⁰. Hoy día no es posible pronosticar qué pacientes responderán a la terapia con el antiangiogénico y/o mantendrán sus beneficios a largo plazo. Por ello, sería muy interesante la identificación de biomarcadores con valor predictivo que pudieran ser de utilidad para seleccionar el tipo de tratamiento y orientar un régimen individualizado.

Otro aspecto que también ha de tenerse en cuenta es que el tratamiento de la DMAE con inyecciones intravítreas de ranibizumab tiene un impacto creciente sobre el gasto sanitario debido al elevado coste del agente y al número creciente de potenciales beneficiarios de esta terapia a causa del progresivo envejecimiento de la población. De acuerdo a los datos del Instituto Nacional de Estadística, en España hay 7.846.027 personas mayores de 65 años, siendo uno de los países en los que la población envejece con mayor rapidez. Según un estudio realizado en una amplia muestra de población española (2132 participantes de más de 65 años seleccionados al azar en una extensa área geográfica), la prevalencia de DMAE neovascular y atrófica es del 1.9% y 1.4%, respectivamente⁶. Sobre estas bases, suponiendo que todos los pacientes con DMAE neovascular accedieran a la terapia con ranibizumab y estimando un promedio de 5 inyecciones por paciente, se puede calcular que el costo anual del tratamiento de la población afectada por la patología ascendería a unos 700 millones de euros anuales sin contar con los derivados de la atención hospitalaria (personal, pruebas...). Es clara la necesidad de identificar qué pacientes se podrían beneficiar del tratamiento y cuáles no responderían al mismo.

Los marcadores genéticos podrían ayudar a establecer una terapia individualizada para la DMAE teniendo en cuenta que este trastorno complejo tiene un fuerte componente genético. Además, la DMAE es relativamente inusual en el sentido de que pocos genes con gran efecto afectan a una considerable proporción de pacientes¹⁵³. En particular, las variantes *CFH* Y402H (rs1061170) y *ARMS2* A69S (rs10490924) se han identificado como los principales factores de riesgo genéticos para la DMAE (véase sección 1.6.1). Sin embargo, no está claro si también pueden influenciar la respuesta a los diferentes tratamientos. Hasta la fecha, hay pocos estudios al respecto y los resultados son contradictorios.

El primer artículo sobre la farmacogenética de la DMAE se publicó en 2007: en un estudio de 88 pacientes con DMAE neovascular que recibieron TPD, no se halló asociación entre el polimorfismo Y402H y la eficacia de la intervención ²⁴¹. Investigaciones posteriores han obtenido resultados contradictorios y así, en unos estudios se ha concluido que existe interacción entre la variante *CFH* Y402H y la respuesta a TPD ^{242, 243}, mientras que en otros no se ha hallado esta asociación ²⁴⁴⁻²⁴⁶. Tampoco hay consenso acerca del efecto de la variante *ARMS2* A69S sobre la respuesta individual a TPD ya que se ha descrito tanto que afecta ²⁴⁷ como que no ^{243, 248} a la eficacia del tratamiento.

Respecto a la terapia con bevacizumab, dos estudios han revelado que existe una correlación entre el genotipo *CFH* de pacientes con DMAE neovascular y la eficacia de inyecciones administradas a intervalos de 6 semanas hasta que la lesión neovascular queda inactiva ^{249, 250}. En ambos casos, al final de la terapia, los homocigotos para el alelo de riesgo (CC) tienen peor resultado que los homocigotos TT y los heterocigotos TC, en términos de agudeza visual. Por el contrario, la variante *ARMS2* A69S no parece influenciar 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 ²⁴⁹.

Recientemente se ha comenzado a analizar la posible interacción entre estas variantes genéticas y la respuesta a la terapia con ranibizumab. En dos estudios, no se ha hallado una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo *CFH* y la respuesta al agente antiangiogénico en términos de agudeza visual ^{251, 252}. Sin embargo, en uno de los ensayos se ha observado que los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo 402H requirieron más inyecciones de ranibizumab ²⁵¹, mientras que en el otro no se detectó asociación entre el número de inyecciones y el genotipo *CFH* ²⁵². Por el contrario, otras investigaciones encuentran que la variante de riesgo *CFH* Y402H influencia la respuesta a ranibizumab, aunque los resultados obtenidos son contradictorios: los homocigotos para la variante de riesgo (CC) presentan la mayor ganancia de agudeza visual en un estudio ²⁵³ o los peores resultados en este parámetro según otros dos análisis ^{254, 255}. La razón de estas discrepancias no está clara.

Los resultados respecto a la influencia del genotipo *ARMS2* sobre la respuesta a ranibizumab también son conflictivos. Un estudio prospectivo ha mostrado su correlación con la eficacia del anti-VEGF inyectado según el protocolo SUSTAIN y ha revelado que los pacientes homocigotos para la variante 69S no mejoran su agudeza visual a pesar del descenso en el grosor central retiniano determinado por OCT²⁵⁴. Sin embargo, en otro estudio retrospectivo no se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre las variantes de *ARMS2* y la respuesta a la terapia antiangiogénica²⁵².

A la vista de estos resultados, es evidente que se necesitan más estudios con el fin de validar la utilidad de estos marcadores genéticos como posibles factores predictivos de la respuesta a la terapia con ranibizumab.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de esta investigación son los siguientes:

- **1º** Determinar si la cirugía de cataratas mediante facoemulsificación es un factor predisponente para el desarrollo de DMAE neovascular.
- **2º** Analizar la asociación de los polimorfismos **Y402H** (rs1061170) del gen *CFH* y **A69S** (rs10490924) del gen *LOC387715/ARMS2* con la DMAE neovascular en población española de la Comunidad de Madrid.
- **3º** Determinar si el genotipo de los pacientes respecto a los polimorfismos **Y402H** y **A69S** se relaciona con las características clínicas de la patología en el momento del diagnóstico y/o con la respuesta a la terapia con ranibizumab (*Lucentis*®) administrado según el protocolo “*a demanda*.”
- **4º** Evaluar la utilidad de parámetros morfológicos maculares determinados mediante tomografía de coherencia óptica de dominio espectral como factores predictivos de la respuesta a ranibizumab (*Lucentis*®) para su posible aplicación en la práctica clínica.

3. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES

Este trabajo se ha realizado en el Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y ha contado con la colaboración de la Sección de Genómica del Servicio de Análisis Clínicos de dicho Hospital. La investigación ha comprendido dos partes. En la primera se ha analizado el riesgo de aparición de degeneración macular exudativa asociada a la edad inducido por la cirugía de cataratas mediante facoemulsificación. En la segunda parte se ha estudiado la influencia de los polimorfismos rs1061170 (Tyr402His) y rs10490924 (Ala69Ser) de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2*, respectivamente, sobre la incidencia de neovascularización coroidea, fenotipo y evolución de la patología, y respuesta al tratamiento intravítreo con el agente antiangiogénico ranibizumab (*Lucentis*®). El diseño de los estudios se adaptó a las líneas de actuación descritas en la Declaración de Helsinki para la investigación biomédica y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica de Hospital Clínico San Carlos (ANEXOS I y II).

3.1.1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

A todos los participantes, se les solicitó permiso para ser incluidos en el correspondiente estudio mediante un consentimiento informado en el que se explicaban los objetivos del mismo, las exploraciones y, en su caso, las pruebas complementarias que iban a ser realizadas, así como el significado de los resultados que pudieran aparecer. También se dejó constancia de la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento del mismo sin necesidad de exponer motivo alguno y sin que ello supusiera ningún perjuicio de cara a la asistencia facultativa que pudieran precisar (ANEXOS III y IV).

Al finalizar el período de estudio se informó a los participantes de los resultados obtenidos, garantizándose la confidencialidad de los datos genéticos.

3.1.2.- SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

A continuación se exponen los protocolos seguidos para la selección de las muestras en cada uno de los estudios de este trabajo.

3.1.2.1.- Estudio de la influencia de la facoemulsificación sobre el desarrollo de neovascularización coroidea (E1)

Para esta investigación se realizó un estudio de cohortes prospectivo.

Se tomaron pacientes remitidos al Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid desde septiembre de 2009 hasta mayo de 2010 para ser sometidos a cirugía de cataratas. El estudio se desarrolló en la Unidad de Mácula del Servicio de Oftalmología y los datos fueron recogidos por un mismo investigador. El tamaño de la muestra fue calculado, previamente al reclutamiento, mediante el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EEUU) partiendo de los datos disponibles en la bibliografía preexistente al respecto, teniendo en cuenta una hipótesis nula del 50% y una proporción hipotética del 75% para ser biológicamente significativa con un error alfa 0,05 y beta 0,2, y detectar una medida de efecto de 1,8 en los factores más importantes.

Para el reclutamiento se aplicaron los criterios de exclusión esquematizados en la Tabla 3.1. Los pacientes preseleccionados fueron divididos en dos grupos. El primero de ellos se formó con los pacientes en los que no se detectaron signos de DMAE ni en el ojo a intervenir ni en el adelfo. En el segundo grupo se incluyeron aquellos pacientes que presentaban distintos grados de maculopatía asociada a la edad (MAE) en el ojo a estudio pero nunca signos de DMAE avanzada (ni atrofia geográfica ni neovascularización coroidea). La edad media de ambos grupos fue similar para hacerlos comparables.

Es importante destacar que entre los pacientes diagnosticados de catarata en rango quirúrgico remitidos para facoemulsificación y que fueron inicialmente preseleccionados para formar parte del estudio, uno tuvo que ser excluido por presentar en el momento preoperatorio una neovascularización coroidea no diagnosticada.

Al final del reclutamiento, los grupos quedaron constituidos por 93 pacientes con mácula normal y 79 pacientes con DMAE incipiente. El período de seguimiento de todos y cada uno de los pacientes tras la intervención quirúrgica fue de 12 meses.

Tabla 3.1.- Criterios de exclusión aplicados en el reclutamiento de pacientes para el estudio de la influencia de la facoemulsificación sobre el desarrollo de neovascularización coroidea.

- Presencia de anomalías en polo posterior que puedan originar neovascularización coroidea: nevus, estrías angioides, corioidopatía serosa central, enfermedades retinianas heredo-degenerativas, coroidosis miópica, retinopatía diabética y coroiditis.
- Presencia de NVC asociada a alguna de las anteriores patologías o a corioidopatía polipoidea.
- Presencia conocida de neovascularización en el ojo a estudio. (NO el contralateral).
- Uso de prostaglandinas tópicas en el ojo a estudio.
- Miopía magna, longitud axial > 26 mm.
- Presencia de retinopatía diabética (NO sólo diabetes).
- Antecedentes de traumatismo ocular.
- Proceso infeccioso activo.
- Patología sistémica mal controlada: Diabetes Mellitus, Insuficiencia renal crónica.
- Intolerancia a cualquiera de los estudios preoperatorios necesarios para la realización de la investigación.
- Retraso mental o cualquier otra limitación para la obtención del consentimiento informado.
- Imposibilidad para cumplir con las visitas programadas en el estudio.
- Participación en cualquier otra investigación en los seis meses previos al inicio del estudio.

3.1.2.2.- Estudio de la relación de los polimorfismos Y402H y A69S de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2* con la incidencia de la DMAE exudativa (E2)

Para comparar la frecuencia de los alelos de riesgo en sujetos con mácula normal y en pacientes diagnosticados de DMAE neovascular se realizó un estudio de casos-contrroles. El tamaño de la muestra fue calculado, previamente al reclutamiento, de forma análoga a la descrita en la sección 3.1.2.1.

Los controles fueron 117 pacientes seleccionados entre aquellos que se sometieron a cirugía de cataratas en el Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos, durante el período comprendido entre enero y julio de 2011. A todos ellos se les realizó funduscopia y tomografía de coherencia óptica para descartar a los que pudieran presentar alteraciones maculares. Los casos fueron 103 pacientes que llevaban a cabo su seguimiento en la Unidad de Mácula del Servicio por neovascularización coroidea en el curso de una DMAE.

Los criterios de exclusión son los mismos que en la sección 2.1.2.1, añadiendo los siguientes criterios adicionales:

Controles:
- pacientes cuya pérdida de agudeza visual no se debiera a la presencia de cataratas.
- pacientes con catarata cuya edad fuese inferior a 60 años, para no incluir como controles a personas que por su corta edad, pudieran desarrollar una maculopatía más adelante.
Casos:
- pacientes que hubieran sido tratados ya de su proceso neovascular en otros Centros.
- pacientes cuyo ojo afecto a estudio hubieran recibido en nuestro Centro un tratamiento diferente a ranibizumab intravítreo.
- pacientes que hubieran sido intervenidos de catarata en los seis meses previos al diagnóstico de neovascularización coroidea.

3.1.2.3.- Estudio de la influencia de los polimorfismos Y402H y A69S de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2* sobre la evolución de la DMAE exudativa y su respuesta al tratamiento con ranibizumab (*Lucentis*®) (E3)

Para llevar a cabo esta investigación se realizó un estudio retrospectivo con los 103 pacientes afectados de neovascularización coroidea. Se trata de pacientes remitidos a la Unidad de Mácula del Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos desde el año 2006 que fueron diagnosticados de neovascularización coroidea mediante angiografía fluoresceínica y han recibido tratamiento con ranibizumab intravítreo en nuestro Centro. Los pacientes han sido seguidos hasta, al menos, la recogida final de datos en febrero de 2012. Se tomó un ojo por paciente. Cuando las manifestaciones exudativas eran bilaterales, se tomó el

ojo de diagnóstico más reciente, para evitar lesiones muy evolucionadas por diagnóstico tardío. Los criterios de exclusión son los descritos en la sección 2.1.2.2 (Grupo “Casos”).

3.2.- METODOLOGÍA DE EXPLORACIÓN CLÍNICA

3.2.1.- TOMA DE AGUDEZA VISUAL

La agudeza visual se determinó con un optotipo ETDRS (*Lighthouse International, New York, EEUU*) en una sala acreditada para toma de agudeza visual en ensayos clínicos, con las mismas condiciones de luminancia y distancia al paciente. El procedimiento fue realizado por personal de enfermería entrenado, siendo siempre las mismas dos enfermeras quienes llevaron a cabo todas las determinaciones.

Para los pacientes del estudio **E1**, la medida se tomó antes de la cirugía de cataratas, y al mes y al año tras la intervención quirúrgica.

En los pacientes de neovascularización coroidea participantes en el estudio **E3**, la medida de agudeza visual se recogió para la primera visita, tras cada inyección de ranibizumab de la dosis de carga y para cada año tras el diagnóstico. Se anotó el número total de letras leídas por el sujeto en condición monocular. Este valor corresponde a la agudeza visual si el examen se realiza con el paciente situado a un metro del optotipo (casos de baja agudeza visual). Si se realiza a 4 metros, a la cantidad anterior se le suma 30.

3.2.2.- RETINOGRAFÍA

La retinografía se realizó a los pacientes del estudio **E1** antes de la cirugía de cataratas y en cada visita posterior, previa midriasis farmacológica con colirio de tropicamida al 0,5% (*Alcon Laboratories Inc, Forth Worth, EEUU*). Los exámenes se realizaron con un retinógrafo Canon (*Canon CD-DGi, Irvine, EEUU*) centrando la imagen en polo posterior y fueron efectuados por el mismo investigador en condiciones de baja luminosidad ambiente.

Para la caracterización de las imágenes fundoscópicas se utilizaron los siguientes criterios:

- **Criterios de diagnóstico de MAE o DMAE incipiente:** presencia en fondo de ojo, sin afectar a la agudeza visual del paciente, de drusas o de cambios en el EPR. En el caso de las drusas, existe una disparidad para su clasificación en el plano internacional ya que el “*International System*” considera drusas blandas a las de diámetro mayor de 63 micras⁴⁹, mientras que la clasificación de *Wisconsin* considera como drusas blandas con seguridad a aquellas mayores de 125 micras⁴⁸. En nuestro caso se siguió este último criterio considerando que existía MAE si el paciente presentaba al menos una drusa de más de 125 micras (el grosor de una vena próxima al nervio óptico), cinco o más drusas de tamaño pequeño (menores de 125 micras), o anomalías del EPR, especialmente áreas de hiperpigmentación (estadio II del AREDS)⁵⁰.
- **Criterios de diagnóstico de DMAE avanzada atrófica:** presencia de una placa de atrofia en el EPR (permite la visualización de los vasos coroideos) de más de 175 micras de diámetro.
- **Criterios de diagnóstico de DMAE avanzada exudativa:** presencia de neovascularización coroidea derivada de la degeneración de la mácula. Se excluyeron todos aquellos casos de neovascularización no provenientes de la DMAE (véanse criterios de exclusión).

3.2.3.- ANGIOGRAFÍA

La angiografía fluoresceínica (AFG) se realizó según la práctica habitual del Servicio, con la inyección, previa firma del consentimiento informado pertinente (ANEXO V), en las venas del dorso de la mano o antecubitales de 5 ml de fluoresceína sódica al 10% (*Novartis Farmacéutica S.A., Barcelona, España*) de forma mantenida durante 3 a 4 segundos. La toma de imágenes se llevó a cabo mediante el angiógrafo HRA-II (Heidelberg Retina Angiograph; *Heidelberg Engineering Inc. Heidelberg, Alemania*) durante un mínimo de 5 minutos de examen. El HRA-2 posee un sistema láser confocal de barrido, lo que permite la obtención de imágenes de alto contraste.

La AFG se realizó obligatoriamente a todos los participantes en el estudio **E1** en los que existió sospecha de aparición de NVC durante el período de seguimiento. Como criterios de sospecha de NVC se han utilizado en este estudio las siguientes evidencias detectadas mediante retinografía:

- lesión subretiniana grisácea o amarillenta, redondeada u ovalada, rodeada o no de un anillo de pigmento o de sangre,
- edema subretiniano o intrarretiniano, cistoide, por exudación de los neovasos,
- hemorragias subretinianas, intrarretinianas, o hemovítreo, por sangrado de los mismos,
- desprendimiento de epitelio pigmentario tipos fibrovascular y vascularizado,
- pliegues radiales retinocoroideos, como signo indirecto.

La AFG también estaba incluida de forma rutinaria en la visita inicial de los pacientes en seguimiento en la Unidad de Mácula por DMAE exudativa (estudio **E3**).

En algunos pacientes se realizó también angiografía con verde de indocianina, especialmente en aquellos casos en los que la AFG sugirió la existencia de vasculopatía coroidea polipoidea (VCP) o proliferación angiomasosa retiniana (RAP). Tras la obtención del consentimiento informado (ANEXO VI), el procedimiento incluyó la administración de 5 ml de verde de indocianina (*Pulsion Medical System, Munich*) a concentración de 5 mg/ml vía intravenosa, de forma análoga a la AFG, y la toma de imágenes sucesivas con el angiógrafo HRA-II durante un mínimo de diez minutos.

En el momento del diagnóstico, las NVC se clasificaron en:

- según su comportamiento angiográfico:
 - clásicas, predominantemente clásicas, parcialmente clásicas, mínimamente clásicas, ocultas, VCP y RAP.
- según su localización:
 - extrafoveales, yuxtafoveales y subfoveales.

3.2.4.- TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA DE DOMINIO ESPECTRAL (SD-OCT)

En todos los apartados de esta investigación, se utilizó el mismo tomógrafo que emplea la tecnología de dominio espectral: Spectralis HRA–OCT (*Heidelberg Engineering Inc. Heidelberg, Alemania*) equipado con la versión 5.4 de software (Figura 3.1). El Spectralis SD-OCT es capaz de realizar 40.000 barridos axiales (A-scans) por segundo, lo que se traduce en imágenes tomográficas de alta resolución (1,9 mm en profundidad, y resoluciones transversal

y axial de 14 y 3,9 μm respectivamente) y cuenta con el sistema “*TruTrack*” que elimina posibles artefactos debidos a los movimientos oculares.

Los exámenes tomográficos se efectuaron bajo midriasis tras instilación de colirio de tropicamida al 0,5%, adecuando el ajuste de la posición axial del barrido y optimizando el enfoque para permitir la obtención de imágenes de máxima calidad. El modo preferente de plantilla de análisis fue el de seis cortes centrados en fovea. La exploración de los pacientes se realizó mediante un modo de adquisición de imagen de seguimiento, el cual, determinada una imagen de referencia, permite la perfecta comparación de imágenes posteriores sucesivas, tomando los vasos retinianos como referencia para una superposición exacta de imágenes.



Figura 3.1. - Tomógrafo de coherencia óptica de dominio espectral HRA-OCT Spectralis.

Las pruebas de imagen fueron realizadas por el mismo investigador que recogió el resto de los datos para el estudio **E1** y controles del estudio **E2**, y por los mismos tres especialistas de la Unidad de Mácula para los casos del estudio **E2** y el seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio **E3**.

Mediante la OCT, la neovascularización coroidea clásica bien definida se visualiza como un área hiperreflectiva nodular, redondeada, o fusiforme, en contacto o por encima del EPR. Cuando esta manifestación no fue tan evidente, se consideraron los signos indirectos de la presencia de neovascularización coroidea: desprendimiento hemorrágico o seroso del EPR, y/o desprendimiento seroso de la retina neurosensorial.

Los protocolos de análisis incorporados en el Spectralis HRA-OCT, establecen, calculan y analizan múltiples parámetros morfométricos de la fovea a partir de las tomografías realizadas. Los protocolos de análisis empleados en esta investigación son los utilizados específicamente en el Servicio para la adquisición de tomografías. Sin embargo, especialmente en los pacientes afectados de degeneración macular tipo exudativo, es frecuente encontrar errores en la segmentación automática de las imágenes, por lo que cada una de las imágenes utilizadas en los tres estudios ha sido revisada por el investigador que recogió el resto de los datos. Cuando se detectaron errores en la segmentación automática, se procedió a la segmentación manual corregida. Se han recogido las siguientes variables y parámetros tomográficos (ANEXO VI):

- Estudio **E1**:

- Espesor retiniano central (CRT), medido como la mínima distancia desde la capa externa de la membrana de Bruch hasta la depresión foveolar, expresada en micras).
- Máxima altura macular (MAM) (en las 5000 micras centradas en fovea).
- Presencia de desprendimiento del epitelio pigmentario (DEP) y máxima altura del DEP (medida desde la capa externa de la membrana de Bruch hasta la base del EPR levantado).
- Presencia de desprendimiento de retina neurosensorial y su altura.
- Presencia de edema macular cistoide.
- Presencia de fibrosis macular.

- Estudios **E2** y **E3**:

Para el Grupo Control del estudio **E2** sólo se exigió morfología macular normal. Para el Grupo Casos del estudio **E2** y pacientes del estudio **E3** se tomaron los siguientes parámetros:

- 1- Espesor retiniano central (CRT).
- 2- Ancho de las alteraciones retinianas secundarias al proceso neovascular, medidas a nivel de la línea basal del EPR sano.
- 3- Altura de las alteraciones retinianas secundarias al proceso neovascular, medida desde la línea basal del EPR sano hasta retina neurosensorial.

- 4- Integridad de la línea de unión entre los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (IS/OS), determinada como se indica a continuación (Figura 3.2).
- 5- Integridad de la membrana limitante externa (MLE).
- 6- Presencia al diagnóstico de líquido subretiniano.
- 7- Presencia al diagnóstico de desprendimiento del EPR.

Las medidas de 1 a 4 se han repetido para las visitas posteriores a la primera, segunda y tercera inyección de *Lucentis*[®] (fin de la dosis de carga), y posteriormente, al año del diagnóstico, a los dos años, etc.

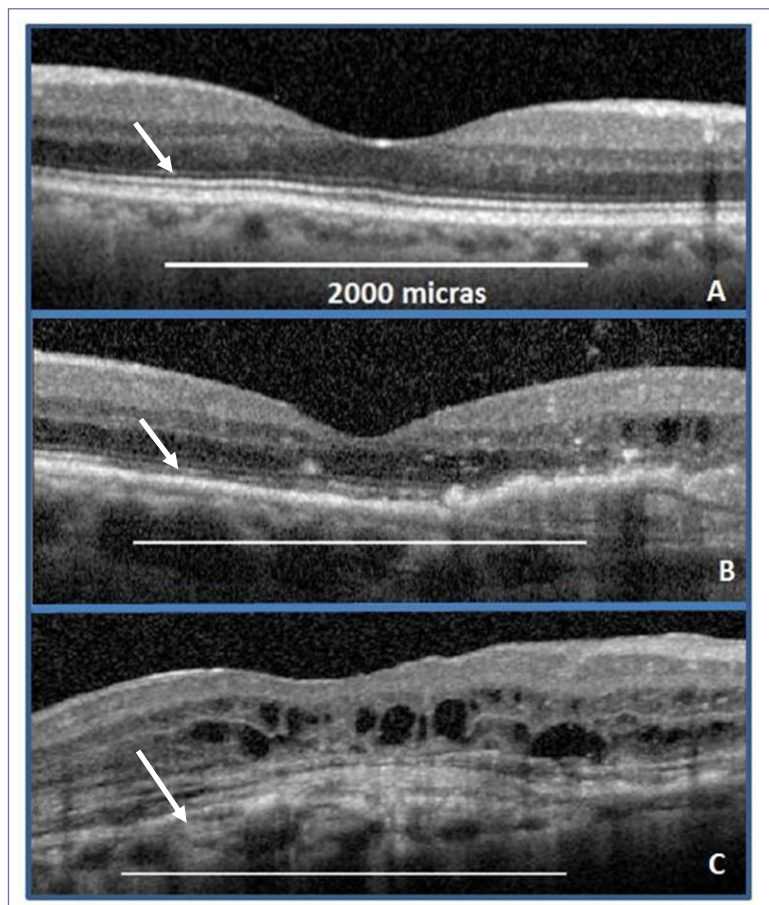


Figura 3.2.- Distintos grados de perturbación de la línea IS/OS en pacientes con degeneración macular exudativa. Las flechas blancas señalan la línea IS/OS en las imágenes de OCT obtenidas en el SD-OCT Spectralis. La integridad de esta línea se evalúa en ambos cortes a lo largo de 1000 micras en cada dirección de la fovea., asignándole los valores 0, 1 ó 2. Arriba: línea IS/OS intacta, Grado 0. Centro: línea IS/OS con perturbaciones correspondientes a Grado 1. Abajo: línea con alteraciones profundas, Grado 2.

La valoración de la integridad de la línea IS/OS se realizó por un procedimiento análogo al descrito por Maheshwary *et al*²⁵⁶. Partiendo de una adquisición de seis cortes, se tomó el

corte vertical evaluándose la línea IS/OS en una distancia de 1000 micras en cada dirección de la fóvea. La perturbación de la línea IS/OS a lo largo de estas 2000 micras se gradúa con valores 0, 1 y 2 de acuerdo a los siguientes criterios: se asigna el valor “0” si la línea IS/OS está indemne en toda esta longitud, “1” si hay defectos que no superan las 200 micras, y “2” si estos defectos son de mayor tamaño. Luego se valora de igual manera en el corte horizontal, 1000 micras hacia nasal y 1000 hacia temporal. La suma de ambas puntuaciones genera una escala continua que abarca desde 0 (integridad total) hasta 4 (mayoritariamente alterada).

3.2.4.1.- Estudio de la reproducibilidad en las medidas de OCT

En el estudio participaron veinte pacientes del estudio **E3**. Todos ellos estaban bajo tratamiento y habían recibido al menos una dosis de ranibizumab. Se incluyó sólo un ojo por cada paciente: el que estaba bajo tratamiento, o cuando estaban los dos, el que presentaba mejor agudeza visual. En unos casos, los ojos a estudio presentaban lesiones quiescentes y espesor retiniano central (CRT) relativamente normal, mientras que otros exhibían lesiones activas y alto valor del CRT. Un 80% de las lesiones eran ocultas, un 10% clásicas y un 10% mínimamente clásicas. En ningún caso se detectó fibrosis.

En la realización del estudio intervinieron dos observadores: *a)* el investigador que realizó todas las medidas sobre las tomografías efectuadas por los expertos en DMAE exudativa durante el seguimiento de los pacientes, y *b)* uno de estos expertos. La OCT macular se realizó a cada paciente bajo dilatación pupilar con tropicamida al 1%. En una sesión, y con un intervalo de tres horas, se obtuvieron dos imágenes por paciente después de haber rechazado aquellas de insuficiente calidad (mínimo de 35 en la puntuación del aparato). Las tomografías de seis cortes centrados en la fóvea se efectuaron con el modo de seguimiento, el mismo utilizado en el seguimiento de los pacientes en condiciones de consulta real. En todas las imágenes generadas se realizaron las mediciones por ambos observadores para determinar el CRT mediante segmentación manual. Con las determinaciones efectuadas se calculó la reproducibilidad inter e intrasesión, e inter e intraobservador como se indica en la sección 3.5.

De un grupo de diez pacientes elegido aleatoriamente entre los participantes en el estudio, se obtuvieron otras dos imágenes válidas entre cinco y siete días después de la

primera visita con el fin de comprobar si durante este corto período podrían producirse cambios en la morfología de la retina por la propia dinámica de la DMAE que influyeran en la variabilidad de las medidas.

3.3.- METODOLOGÍA DE TRATAMIENTOS

3.3.1.- CIRUGÍA DE CATARATAS

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en todos los pacientes mediante facoemulsificación. Para cada paciente, se recogió el tipo de incisión empleada (convencional o microincisional), tipo de facoemulsificador: Stellaris PC® (*Bausch & Lomb Incorporated, Rochester, NY, EEUU*), Millennium® (anterior CX-3000, *Bausch & Lomb Incorporated, Rochester, NY, EEUU*), Whitestar Signature® (*Abbot Medical Optics, Santa Ana, CA, EEUU*), Infinity® (*Alcon Laboratories, Inc., Forth Worth, Texas, EEUU*) o Legacy® (*Alcon Laboratories, Inc., Forth Worth, Texas, EEUU*), tiempo de facoemulsificación (en segundos) y porcentaje de ultrasonidos. Se recogió el tipo de lente implantada: Akreos Adapt AO (*Bausch & Lomb, Inc., Forth Worth, Texas, EEUU*), Rayner (*Rayner Intraocular Lenses Ltd, Hove, Gran Bretaña*), AcrySof SN60WF IQ (*Alcon Laboratories, Forth Worth, Texas, EEUU*), Tecnis TM (*Abbot Medical Optics, Santa Ana, CA, EEUU*), Quatrix esférica (*Croma-Pharma GmbH, Korneuburg, Austria*) categoría del primer cirujano (médico adjunto o médico residente) y presencia de complicaciones quirúrgicas.

El tratamiento pre y postoperatorio fue similar en el grupo con alteraciones maculares y el grupo con mácula normal, llevándose a cabo según los protocolos de nuestro Servicio: limpieza en el preoperatorio mediante toallitas de higiene palpebral y lubricación con lágrima artificial, tratamiento durante una semana con pomada de dexametasona (*Alcon Cusi, Barcelona, España*) y colirio de tobramicina-dexametasona (*Tobradex®, Alcon Cusi, Barcelona, España*) en pauta descendente durante cinco semanas.

Todas las cirugías han estado exentas de complicaciones excepto en un caso. Este paciente, del grupo N, fue excluido del estudio.

3.3.2.- INYECCIONES INTRAVÍTREAS DE RANIBIZUMAB

Para el tratamiento de la neovascularización coroidea en los pacientes con DMAE exudativa, se han empleado inyecciones intravítreas de ranibizumab (*Lucentis*[®]).

Los tres oftalmólogos del Servicio dedicados al diagnóstico, prescripción de tratamiento y seguimiento de los pacientes han sido los mismos desde el año 2006. También han sido los encargados de llevar a cabo las inyecciones intravítreas de ranibizumab (0,5 mg/0,05 ml). Estos expertos no han conocido el perfil genético de los pacientes, para evitar sesgos en el seguimiento, el cual se ha llevado a cabo utilizando idéntico protocolo de acuerdo a las guías aprobadas por la Sociedad Española de Retina y Vítreo²⁵⁷. Los pacientes fueron tratados en quirófano bajo condiciones asépticas. Después de aplicar anestesia tópica (*Anestésico Doble colirio, Alcon Cusi, Barcelona, España*), se procedió a desinfectar los párpados y la piel de la zona periocular con povidona yodada y la superficie ocular con povidona yodada diluida. Se aplicó una hemosteta con lidocaína al 2% (*Braun Medical S.A., Barcelona, España*) sobre la conjuntiva de la zona a inyectar durante cinco segundos. La aguja de inyección, de un calibre de 30 G (*Sterican*[®], *Braun Medical S.A., Barcelona, España*) se introdujo en esclera a una distancia de 3,5-4,0 mm por detrás del limbo, en función de que se tratase de pacientes pseudofáquicos o fáquicos, comprimiéndose el sitio de inyección posteriormente a la retirada de la aguja con una hemosteta seca con el fin de evitar el reflujo. Se verificó la perfusión de la arteria central de la retina y se prescribieron gotas de Tobrex[®] (tobramicina 0,3%, *Alcon, El Masnou, Barcelona, España*) 3 veces al día durante tres días. Las inyecciones sucesivas fueron aplicadas cada vez en un punto escleral distinto.

Se ha realizado una primera fase de tratamiento mediante la aplicación de tres inyecciones mensuales como dosis de carga e inyecciones adicionales “a demanda”, según criterios angiográficos (actividad de la lesión), tomográficos (aumento en CRT de al menos 100 micras, presencia de hemorragia macular, presencia de NVC clásica nueva en AFG, persistencia de fluido 1 mes post-tratamiento, aparición de líquido subretiniano, presencia de quistes intrarretinianos, y crecimiento de DEP) y funcionales (pérdida de agudeza visual de 5 o más letras ETDRS con evidencia de fluido macular). Estos criterios de retratamiento son los empleados en la ampliación efectuada durante el segundo año del estudio PrONTO^{228,229}.

Se han recogido las siguientes variables:

- el número total de inyecciones,
- el tiempo de latencia desde la última inyección de *Lucentis*® de la dosis de carga hasta la siguiente inyección adicional (“latencia hasta la cuarta dosis”),

La mediana del tiempo de seguimiento de los pacientes en la unidad fue de 28,5 meses con un rango intercuartílico entre $P_{25}=20$ y $P_{75}=45$ meses.

3.4.- ANÁLISIS GENÉTICOS

Con el objetivo de analizar la relación de los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* con la incidencia de neovascularización coroidea (estudio **E2**), así como su posible influencia sobre las manifestaciones fenotípicas de la patología y respuesta al tratamiento con ranibizumab (estudio **E3**), se realizó el análisis genético de 117 sujetos control y 103 pacientes que llevaban a cabo su seguimiento en la Unidad de Mácula del Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos por neovascularización coroidea en el curso de una DMAE.

El estudio de ambos polimorfismos se efectuó a partir de muestras de sangre periférica extraídas en el período comprendido entre marzo y julio de 2011. Previamente se obtuvo la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica de dicho Hospital, así como el consentimiento informado de todos los participantes (ANEXOS II y IV).

3.4.1- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DEL ADN

Se extrajo a cada paciente una muestra de 5 ml de sangre venosa periférica que se recolectó en un tubo con EDTA para evitar la coagulación de la muestra, previamente identificado. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su procesamiento, en arcones frigoríficos equipados con sistemas de monitorización de control de temperatura. Para la extracción del ADN se ha utilizado el robot EZ1® (*QIAGEN*) que realiza la purificación del ADN mediante partículas magnéticas usando el kit de extracción EZ1® DNA Blood (*QIAGEN*).

El ADN se obtuvo a partir de 350 μ l de sangre. Tras un lisado celular, el ADN se une a la sílice que recubre las partículas magnéticas del kit. Mediante un sistema magnético, estas partículas se separan del lisado y tras varios procesos de lavados, se eluye el ADN en un volumen final de 200 μ l.

3.4.2.-CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

La concentración de ADN fue evaluada mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop 1000 (*Thermo Scientific*). Para la calibración del aparato se utilizó agua destilada. Esta cuantificación por espectrofotometría está basada en la propiedad de las bases púricas y pirimidínicas de absorber luz con un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm (D_{260}). Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de ADN de 50 μ g/ml. Por tanto, la concentración de ADN será: $[\text{ADN}] = D_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución de la muestra}$.

Se determinó la pureza del ADN extraído ya que durante el proceso de aislamiento puede producirse una contaminación proteica. Para ello, se midió la absorbancia de las muestras a 280 nm (D_{280}), longitud de onda a la cual las proteínas presentan el máximo de absorción, calculándose la relación D_{260} / D_{280} . Un valor comprendido entre 1.8 y 2 indica un rango óptimo de pureza.

Conocida la concentración de ADN, las muestras con pureza adecuada se distribuyeron en alícuotas en tubos correctamente identificados y se almacenaron a -20° C hasta la realización de los análisis.

3.4.3.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La amplificación del fragmento del exón 9 del gen *CFH* que contiene el polimorfismo rs1061170 T/C se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador convencional. La mezcla de reacción contenía 30 ng del DNA del paciente, 15 pmol de cada cebador²⁵⁸ (Tabla 3.2), 2.5 mM de MgCl_2 , 200 μ M de dNTPs, 0.7 U de Taq ADN polimerasa, 2.5 μ l de tampón estándar para PCR y la cantidad necesaria de agua libre de RNAasas hasta completar un volumen final de 25 μ l. En cada ronda de amplificación se incluyó un control negativo para excluir una posible contaminación de los reactivos. El control

contenía todos los reactivos de la mezcla de amplificación excepto el ADN que fue sustituido por agua destilada.

Tabla 3.2.- Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación del fragmento que contiene el polimorfismo rs1061170 T/C del gen *CFH* mediante PCR. Descritas por Brantley *et al.* 2007²⁵⁸.

Cebador	Secuencia
Sentido	5' – CTT TGT TAG TAA CTT TAG TTC GTC TTC AG – 3'
Antisentido	5' – ACA AGG TGA CAT AAA CAT TTT GCC – 3'

La amplificación del fragmento del exón 1 del gen *LOC387715/ARMS2* que contiene el polimorfismo rs10490924 G/T se realizó igualmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contenía 30 ng del DNA del paciente, 20 pmol de cada cebador²⁵⁹ (Tabla 3.3), 2.5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTPs, 0.7 U de Taq ADN polimerasa, 2.5 μl de tampón estándar para PCR y la cantidad necesaria de agua libre de RNAasas hasta completar un volumen final de 25 μl. En cada ronda de amplificación se incluyó un control en el que el ADN se reemplazó por agua destilada.

Tabla 3.3.- Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación del fragmento que contiene el polimorfismo rs10490924 G/T del gen *LOC387715/ARMS2* mediante PCR. Descritas por Pulido *et al.* 2007²⁵⁹.

Cebador	Secuencia
Sentido	5' – AGT GAG ATG GCA GCT GGC TT – 3'
Antisentido	5' – GGT AAG GCC TGA TCA TCT GCA – 3'

El programa de amplificación de los fragmentos seleccionados de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2* consistió en un ciclo inicial de siete minutos a 95° C para desnaturalizar el ADN, seguido de 35 ciclos de amplificación compuesto cada uno de ellos por una

desnaturalización a 95° C durante treinta segundos, una hibridación entre los cebadores y las secuencias específicas del ADN durante treinta segundos a 61° C para el gen *CFH* y a 62° C para el gen *LOC387715/ARMS2*, y una extensión durante treinta segundos a 72° C. Finalmente se realizó un ciclo a 72° C durante 10 minutos para la elongación final.

3.4.4.- COMPROBACIÓN DEL AMPLIFICADO

La determinación de la correcta amplificación de cada fragmento y de la pureza del amplificado fue el paso previo al análisis de los amplificados, para excluir las muestras contaminadas o insuficientes.

Para ello, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2 % que permiten la separación de fragmentos de ADN entre 100 y 2000 p.b. Cada gel se preparó con 27 ml de agua destilada, 3 ml de tris-acetato EDTA 10X (TAE) y 0.6 g de agarosa. Esta mezcla se llevó a ebullición e inmediatamente después se añadieron 3 µl de bromuro de etidio, compuesto que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y que permite visualizar los fragmentos de éste cuando se expone el gel a radiación ultravioleta. La mezcla se depositó en un soporte hasta su gelificación a temperatura ambiente.

Las muestras a aplicar en el gel estaban compuestas por 10 µl del amplificado y 2 µl de azul de bromofenol (como marcador del frente de la electroforesis). Además se prepararon un blanco con el amplificado del control negativo y un marcador de peso molecular formado por 10 µl de agua destilada, 2 µl de azul de bromofenol y 2 µl del producto “ADN Molecular Weight Marker VIII” (*Roche*) que muestra 17 fragmentos de entre 19 y 1114 p.b. Tras la electroforesis durante 20 minutos a 100 V y a temperatura ambiente, los geles se revelaron por exposición a radiación de luz ultravioleta, lo que permitió visualizar los amplificados como bandas blancas.

La Figura 3.3 muestra el resultado de los análisis; se aprecian las bandas de 450 p.b. correspondiente al amplificado del gen *CFH* (Figura 3.3 A) y de 384 p.b. del amplificado del gen *LOC387715/ARMS2* (Figura 3.3 B).

Con este procedimiento se comprobó que cada amplificado era del tamaño esperado, acorde con los cebadores utilizados y se evaluó la ausencia de contaminación en la reacción de PCR mediante el blanco introducido. Sólo aquellos amplificados con tamaño correcto y sin contaminación fueron digeridos.

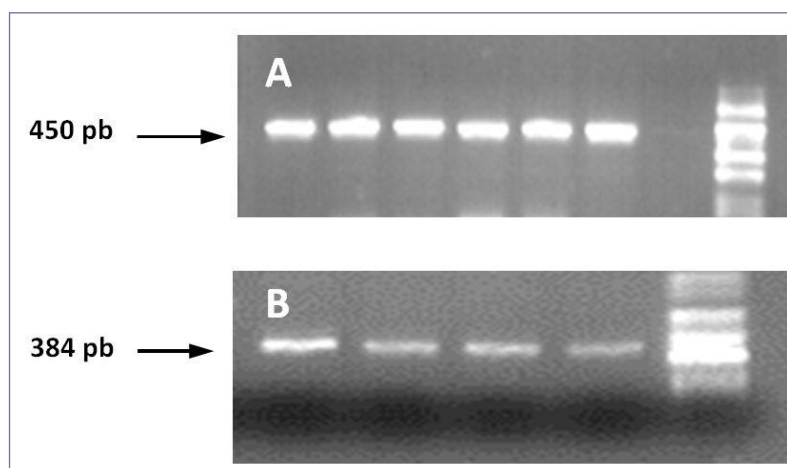


Figura 3.3.- Comprobación de los amplificados. Geles de agarosa al 2% que muestran las bandas de 450 p.b. del amplificado del gen *CFH* (A) y de 384 p.b. del amplificado del gen *LOC387715/ARMS2* (B).

3.4.5.-DIGESTION DEL AMPLIFICADO

Consiste en someter a los amplificados a una digestión enzimática mediante endonucleasas o enzimas de restricción. Estas enzimas reconocen secuencias palindrómicas concretas y cortan los enlaces fosfodiéster de la doble hebra de ADN en sitios específicos. El resultado del corte es la escisión en fragmentos de un tamaño determinado.

Para el gen *CFH*, la enzima empleada (*NlaIII*, *Sigma*) reconoce la secuencia CATG y realiza un corte detrás de la guanina. El polimorfismo específico estudiado para dicho gen determina la presencia de un corte adicional cuando existe el cambio T/C. Por ello, el fragmento principal obtenido tras la digestión mide 203 pares de bases si está presente la mutación y 289 pares de bases en los pacientes que no la presentan, en los cuales la secuencia es TATG. El proceso de digestión se realizó a 37° C durante 180 minutos y a 65° C durante 20 minutos. Para ello, se preparó una mezcla de reacción que contenía 2 µl de tampón específico para la enzima, 0.2 µl

de BSA, 5 U de enzima y 5 μ l de amplificado en un volumen final de 20 μ l que se completó con agua libre de RNAasas.

Para el gen *LOC387715/ARMS2*, la enzima elegida (*Fnu4HI*, *Sigma*) reconoce la secuencia GCNGC y realiza un corte detrás de la primera citosina. Esto sucede en los pacientes no mutados. En los mutados la secuencia es GCNTC y no se produce corte enzimático. Así, en los no mutados, del proceso de digestión resultan cuatro fragmentos de 199, 75, 71 y 49 pares de bases, mientras que en los mutados se originan tres fragmentos de 270, 75 y 49 pares de bases. El fragmento principal obtenido tras la digestión mide 199 pares de bases cuando no existe mutación y 270 pares de bases si está presente. El proceso de digestión se realizó a 37° C durante 180 minutos y a 80° C durante 20 minutos. La mezcla de reacción contenía 2 μ l de tampón específico para la enzima, 10 U de enzima y 10 μ l de amplificado en un volumen final de 20 μ l que se completó con agua libre de RNAasas.

Los productos de digestión de los dos genes se analizaron de la misma manera mediante electroforesis en gel de acrilamida al 12%. El gel constaba de agua destilada, TBE 5%, acrilamida, TEMED y APS. Las muestras a aplicar contenían 12 μ l del producto digerido a los que se añadieron azul de bromofenol y glicerol hasta un volumen final de 16 μ l. Las condiciones en las que se realizó la electroforesis fueron 110 voltios y 70 minutos y temperatura ambiente.

Tras la electroforesis, se sumergieron los geles en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante quince minutos y posteriormente se sometieron a una fuente de luz ultravioleta en un transiluminador para visualizar las bandas que representaban los amplificados ya digeridos. En función del tamaño de los fragmentos generados por las enzimas de restricción al encontrar las distintas secuencias (mutadas y no mutadas), se obtuvieron diferentes patrones de bandas en los dos genes estudiados (Figura 3.4).

3.4.6.- SECUENCIACIÓN

Posteriormente todas las muestras se secuenciaron para comprobar los resultados obtenidos. La secuenciación consistió en una nueva amplificación del producto amplificado

utilizando nucleótidos marcados. Cada muestra se amplificó por duplicado para secuenciar por separado las dos hebras del ADN.

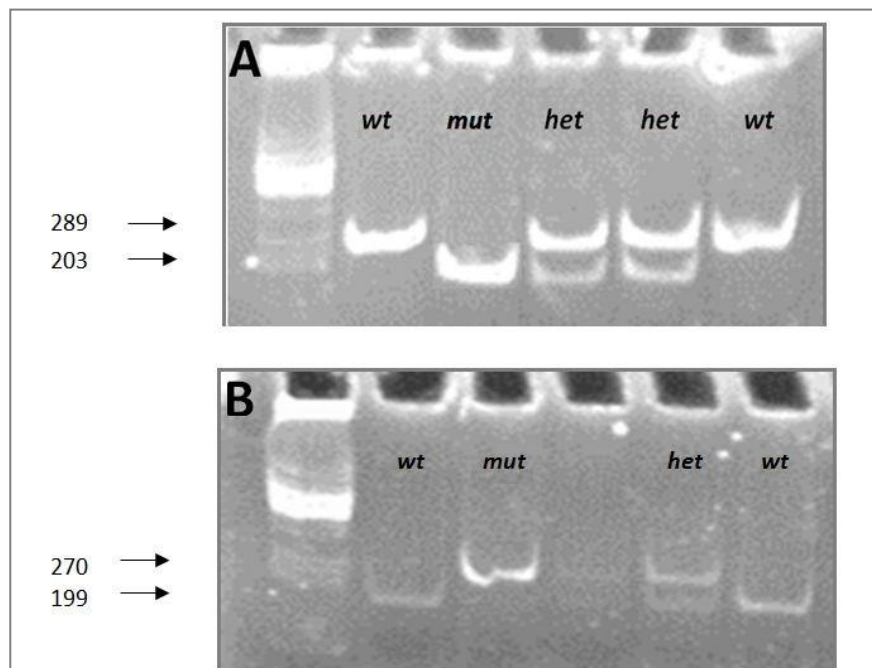


Figura 3.4. - Geles de acrilamida de los productos de digestión enzimática de los amplificados de los genes *CFH* (A) y *LOC387715/ARMS2* (B). (A) Se observan los tres posibles genotipos para el gen *CFH*: Homocigoto TT (*wt*), banda de 289 p.b.; Heterocigoto TC (*het*), bandas de 289 y de 203 p.b.; Homocigoto mutado CC (*mut*), banda de 203 p.b. (B) Se distinguen los tres posibles genotipos para el gen *LOC387715/ARMS2*: Homocigoto GG (*wt*), banda 199p.b.; Heterocigoto TG (*het*), bandas 270 y 199 p.b.; Homocigoto mutado TT (*mut*), banda de 270 p.b.

Los amplificados de ambos genes se sometieron a las mismas condiciones para la secuenciación. Se preparó una mezcla de 2 μ l de Premix Big Dye (*Applied Biosystems TM*), 2.5 μ l de producto amplificado, 1 μ l de cebador (sentido o antisentido, 10 μ M) y 4.5 μ l de agua libre de RNAasas. El programa de amplificación para la secuenciación consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 96 $^{\circ}$ C durante un minuto y a continuación se realizaron 25 ciclos, cada uno de ellos compuesto por: 10 segundos a 96 $^{\circ}$ C, 5 segundos a 50 $^{\circ}$ C y 4 minutos a 60 $^{\circ}$ C. Los productos amplificados se sometieron a varios lavados y se precipitaron con etanol. El ADN purificado se resuspendió en 30 μ l de formamida, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos a 37 $^{\circ}$ C, y se sometió a una electroforesis capilar en un secuenciador ABI3100 $^{\circ}$ (*Applied Biosystems*). Las Figuras 3.5 y 3.6 muestran imágenes con los resultados de la secuenciación de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2* de algunos de los pacientes participantes en el estudio.

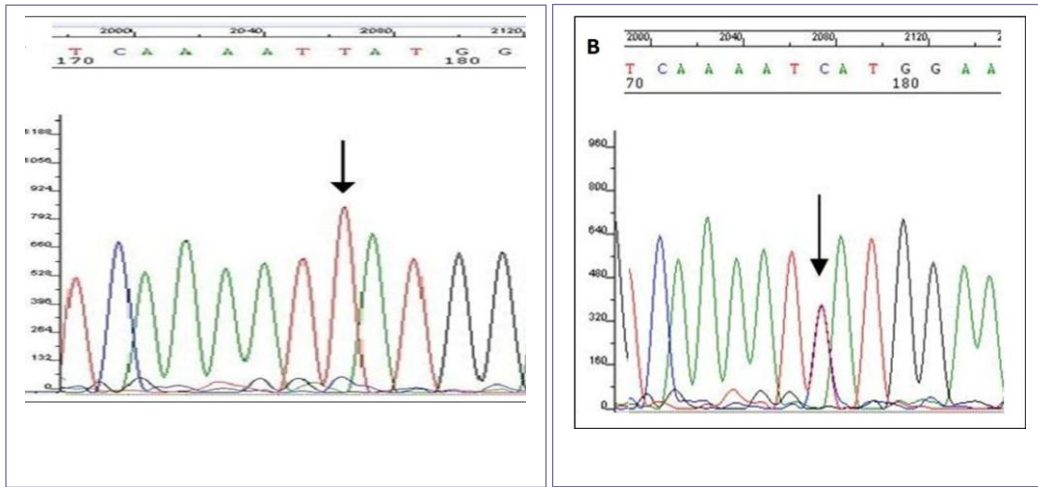


Figura 3.5. - Secuencia CFH. (A) Sentido, homocigoto TT, paciente 47. (B) Sentido, heterocigoto TC, paciente 46.

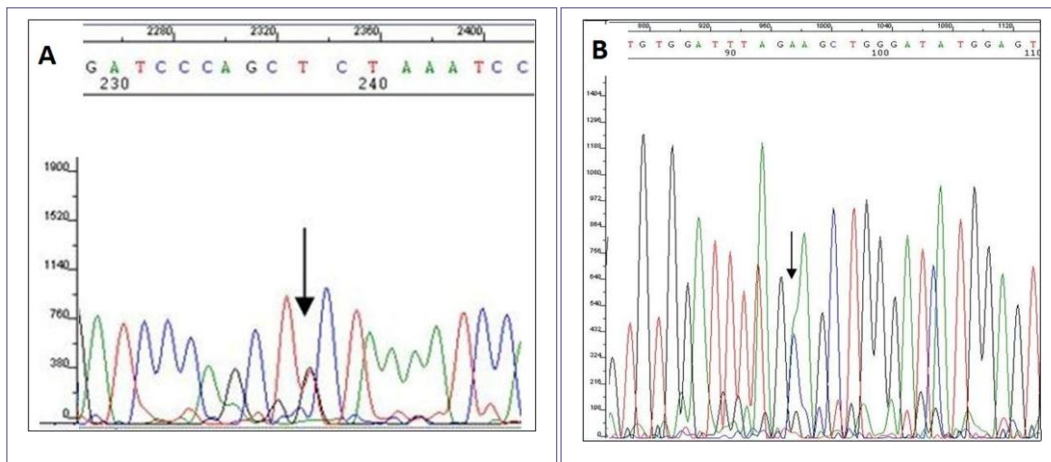


Figura 3.6.- Secuencia *LOC387715/ARMS2*. (A) Sentido, heterocigoto TG paciente 85. (B) Antisentido, heterocigoto CA, paciente 85.

3.5.- TRATAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación se describen los métodos de análisis estadístico utilizados para el tratamiento de los datos obtenidos en los diferentes estudios de esta investigación.

- Estudio de la reproducibilidad de las medidas de OCT

Se ha empleado el método de Bland-Altman²⁶⁰ para el estudio de la concordancia entre medidas. Los parámetros calculados, tras contrastar la normalidad de las variables implicadas mediante el test de Shapiro-Wilk, fueron: la diferencia media (DM), la desviación estándar de

las diferencias (DE), el coeficiente de repetibilidad ($CDR = 1,96 \times DE$) y los límites de acuerdo al nivel de 95% ($DM \pm CDR$). También se han calculado los coeficientes de correlación intraclase (CCI) utilizando el software del programa estadístico SPSS para Windows (versión 18,0, SPSS Inc., Chicago, EEUU).

- Estudio de la influencia de la facoemulsificación sobre el desarrollo de neovascularización coroidea (E1)

Se ofrece el análisis descriptivo de las variables cuantitativas como valores medios con sus desviaciones estándar y de las variables cualitativas como porcentajes. La relación entre los diagnósticos con retinografía y OCT se ilustra mediante la correspondiente tabla de contingencia. La comparación entre las medidas tomográficas antes y después de la cirugía de cataratas se ha realizado con el test *t* de Student. Tomando como referencia la tomografía de coherencia óptica, se ofrecen los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la retinografía.

- Estudio de la relación de los polimorfismos Y402H y A69S de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2* con la incidencia de la DMAE exudativa (E2)

La ley de Hardy-Weinberg establece que en una población grande, panmítica y en ausencia de fuerzas evolutivas que la afecten, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes generación tras generación. Se han determinado dichas frecuencias para cada uno de los genes estudiados, examinándose en cada caso la conformidad de las distribuciones alélicas al equilibrio de Hardy-Weinberg. Se estableció que los alelos en cada gen estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg si las frecuencias de homocigotos y heterocigotos no diferían significativamente de las frecuencias esperadas ($p > 0.05$) empleando el test de *Chi-cuadrado*. Para cada gen se calculó la frecuencia alélica en los casos y los controles y se estimó el *odds ratio* para contabilizar el tamaño del efecto, calculándose el valor de *p* asociado a la significación del mismo utilizando el test de *Chi-cuadrado*. Para llevar a cabo los análisis descritos se ha utilizado el software del programa estadístico SPSS para Windows (versión 18,0).

- Estudio de la influencia de los polimorfismos Y402H y A69S de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2* sobre la evolución de la DMAE exudativa y su respuesta al tratamiento con ranibizumab (E3)

Para establecer la relación entre agudeza visual y las variables como la edad, número de retratamientos, o espesor retiniano central se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson o el coeficiente de Rho de Spearman, según se cumplieran o no las condiciones de normalidad. Para la comparación de más de dos medias, como en el caso de los diferentes genotipos, se ha empleado el test ANOVA, utilizando el método LSD (*least significant difference*) de Fisher para comparaciones a posteriori sólo cuando el test de ANOVA resultó significativo. Se ha elegido el test de Kruskal-Wallis cuando no se cumplían las condiciones de normalidad u homocedasticidad (p valor en la prueba de Shapiro-Wilk o de Levene menor de 0.05) y el test de Dunn para las comparaciones a posteriori en estos casos.

Para estimar la relación entre los parámetros morfológicos de las tomografías (líneas IS/OS y MLE) y el estado funcional se han utilizado modelos de regresión lineal múltiple. Asimismo, la posible relación entre genotipo/mejoría funcional y genotipo/necesidad de retratamientos se ha evaluado mediante regresión múltiple, empleando variables indicadoras (*dummy*) e incluyendo los posibles factores de confusión en el modelo para descartar el posible sesgo del efecto detectado para los genotipos. Considerando el conjunto de factores se ha establecido el modelo máximo, eliminando del mismo a continuación mediante el procedimiento *hacia atrás* las variables que no resultaron significativas. Los análisis se han realizado con el programa estadístico Centurion XVI Statgraphics. (*StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, EEUU*).

Para todos los test se ha considerado estadísticamente significativo el valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

RESULTADOS

4.1.- REPRODUCIBILIDAD DE LA MEDIDA DEL ESPESOR RETINIANO CENTRAL MEDIANTE OCT

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la variabilidad intraobservador (repetibilidad) e interobservador (reproducibilidad) de las medidas del espesor retiniano central (CRT) en pacientes con DMAE neovascular utilizando las imágenes tomográficas obtenidas con el Spectralis HRA-OCT. Diversas investigaciones han mostrado que, para ojos sanos, la reproducibilidad intra e intersesión de las medidas de espesor macular es excelente^{65, 261, 262}. Sin embargo, es previsible que las alteraciones patológicas presentes en los ojos afectados por DMAE tengan un impacto negativo sobre la reproducibilidad de estas medidas, ya que pueden provocar errores en la aplicación automatizada de los algoritmos de segmentación. Por ello, la estimación de estos parámetros es importante para comprobar la fiabilidad de las determinaciones realizadas en la presente Tesis Doctoral mediante SD-OCT.

En la Tabla 4.1 se muestran los coeficientes de correlación intraclass (CCI) para el mismo observador en la primera frente a la segunda determinación (repetibilidad) e interobservador en la primera y en la segunda medición (reproducibilidad).

Tabla 4.1.- Coeficientes de correlación intraclass (CCI) e intervalos de confianza para las medidas del espesor retiniano central en pacientes con DMAE neovascular mediante SD-OCT con Spectralis-HRA.

	Valor	95% Intervalo de confianza
CCI intraobservador ₁ 1ª/2ª medida	1,000	0,999 - 1,000
CCI interobservador _{1/2} 1ª medida	1,000	0,999 - 1,000
CCI intraobservador ₂ 1ª/2ª medida	0,999	0,999 - 1,000
CCI interobservador _{1/2} 2ª medida	0,999	0,999 - 1,000

Valores de CCI superiores a 0,9 se consideran excelentes²⁶³, de forma que nuestros resultados indican una muy alta concordancia entre las diferentes mediciones del CRT en pacientes con DMAE neovascular.

Krebs *et al.*²⁶⁴ han determinado la repetibilidad y reproducibilidad de las medidas del CRT en pacientes con DMAE exudativa, comparando los resultados obtenidos con dos equipos de SD-OCT: el Cirrus (*Carl Zeiss Meditec*) y el Spectralis. Para las medidas automatizadas, los CCI intraobservador e interobservador fueron, respectivamente 0,618 y 0,653 para el Cirrus y 0,934 y 0,861 para el Spectralis. Después de efectuar la corrección manual de los errores de segmentación, estos valores aumentaban hasta 1,000 y 0,999 para el Cirrus y hasta 1,000 en ambos casos para el Spectralis. Por tanto, los resultados obtenidos en esta investigación, tras la corrección manual de los errores de segmentación, coinciden con los previamente publicados utilizando la tecnología SD-OCT de Spectralis.

Aunque el CCI es un índice muy adecuado para cuantificar la concordancia entre diferentes mediciones para el caso de variables numéricas, su expresión en términos absolutos dificulta su interpretación. Por eso, se ha utilizado también el método de análisis de Bland-Altman, más intuitivo y que aporta información con mayor significación clínica.

La Figura 4.1 muestra las representaciones de Bland-Altman²⁶⁰ que permiten evaluar la variabilidad de las medidas del CRT intraobservador₁ (Figura 4.1 A) e interobservador_{1/2} para el segundo conjunto de medidas (Figura 4.1 B). A partir de las gráficas se puede deducir que el aumento del espesor macular no se correlaciona con una mayor diferencia en la media de las medidas intra o interobservador, es decir, el aumento del CRT no afecta a la repetibilidad ni a la reproducibilidad de las medidas. En el primer caso (Figura 4.1 A), el valor medio de las diferencias entre medidas (DM) fue 1,4 micras, la desviación estándar de las diferencias (DE) 6,22 micras, y el coeficiente de repetibilidad (CDR), 12,1 micras. Los límites de acuerdo al 95%, calculados como $DM \pm 1,96 \times DE$, corresponden a 13,5 micras (límite superior) y -10,7 micras (límite inferior). En el segundo caso (Figura 4.1 B), los valores obtenidos para DM, DE, CDR y límites de acuerdo superior e inferior fueron 2,1, 6,85, 13,4, 15,5 y -11,3 micras, respectivamente.

Resultados semejantes se obtienen respecto a la variabilidad de las medidas del CRT intraobservador₂ (CDR = 12,2 micras) e interobservador_{1/2} para el primer conjunto de medidas (CDR = 8,3 micras) (gráficas no mostradas).

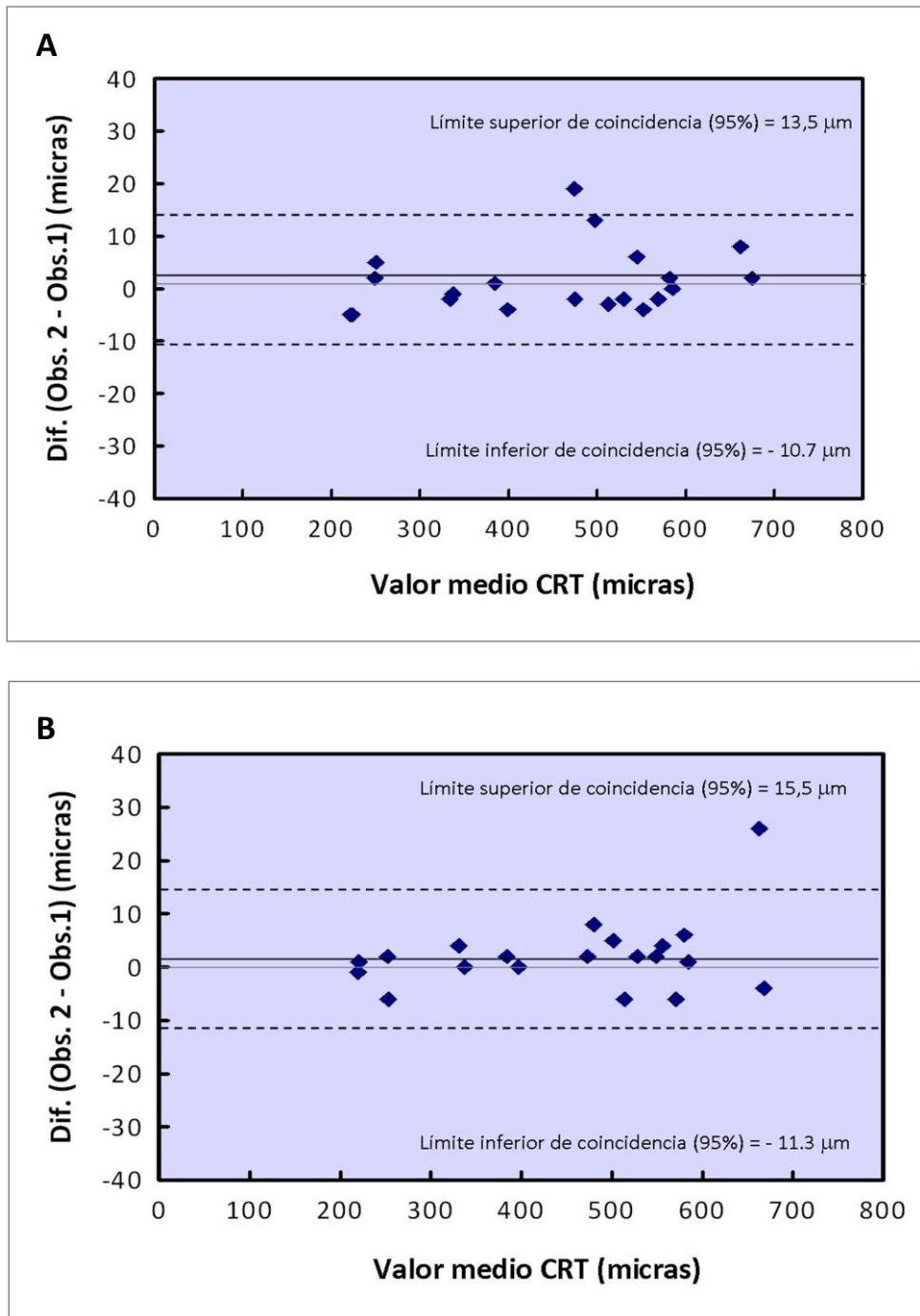


Figura 4.1.- Gráficas de Bland-Altman que representan: (A) las diferencias entre las medidas del CRT del mismo observador (el investigador que realizó el resto de las determinaciones en las imágenes de OCT de la presente investigación) frente al valor medio del espesor macular central; (B) las diferencias entre las medidas de los dos observadores participantes en el estudio frente al valor medio del espesor retiniano central. Los límites de acuerdo al 95% se muestran con líneas discontinuas. Equipo: Spectralis-HRA

En la Tabla 4.2 se recogen los valores del coeficiente de repetibilidad expresado en micras y como porcentaje de la media de cada conjunto de medidas, así como los coeficientes de variación (CoV) calculados.

Tabla 4.2.- Parámetros que reflejan la reproducibilidad de las medidas del espesor retiniano central en pacientes con DMAE neovascular mediante OCT-SD con Spectralis.

	CDR (1,96 x DE) (micras)	CDR como porcentaje de la media de las medidas (%)	CoV (%)
Intraobservador ₁ 1ª/2ª medida	12,1	2,67	1,36
Interobservador _{1/2} 1ª medida	8,3	1,86	0,94
Intraobservador ₂ 1ª/2ª medida	12,2	2,70	1,37
Interobservador _{1/2} 2ª medida	13,4	2,96	1,51
Media ± DE	11,5 ± 3,2	2,54 ± 0,57	1,29 ± 0,24

CDR, coeficiente de repetibilidad; CoV, coeficiente de variación. Segmentación manual de las imágenes de OCT. Los coeficientes de variación se han calculado de acuerdo con el procedimiento descrito por Patel *et al.*²⁶⁵

Por otra parte, los límites de acuerdo al 95% calculados para la repetibilidad y reproducibilidad de las medidas definen un intervalo de concordancia de 23 micras. Esto significa que hay una probabilidad del 95% de que cambios de más de 23 micras en el espesor retiniano central sean debidos realmente a la evolución de la patología macular y no a la variabilidad test-retest de las medidas. Este valor es similar a los hallados por otros investigadores que han descrito que, en imágenes de Spectralis y Cirrus sin errores de segmentación, las variaciones del espesor retiniano central de más de 20²⁶⁴ o 26 micras²⁶⁶, reflejan cambios patológicos con una probabilidad del 95%. En comparación, este valor es de 100 micras para Stratus^{265, 267}, equipo que utiliza la tecnología de OCT de dominio temporal.

Se ha realizado un estudio complementario consistente en repetir, siete días después de la primera sesión, las medidas del CRT en diez pacientes elegidos aleatoriamente entre los veinte que formaban la muestra original. Los dos observadores realizaron las mediciones siguiendo el mismo protocolo. La Figura 4.2 muestra la representación de Bland-Altman de los resultados obtenidos al analizar la variabilidad de las medidas del primer observador.

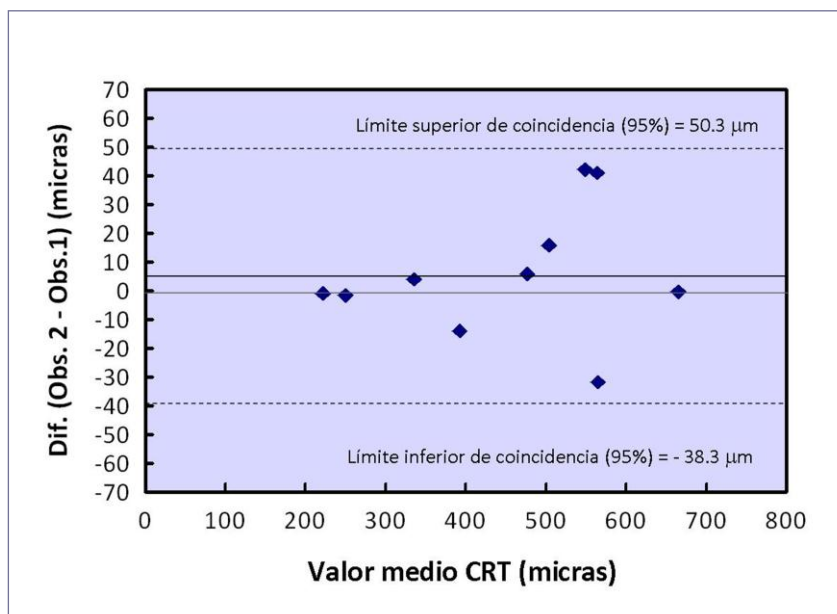


Figura 4.2.- Variabilidad intersesión de las medidas del CRT obtenidas por el observador₁ mediante Spectralis-HRA. La segunda sesión con diez pacientes de DMAE neovascular se realizó 7-10 días después de la primera. Los límites de acuerdo al 95% se muestran con líneas discontinuas.

El CDR aparente fue 44,3 micras y el intervalo de concordancia 88,6 micras. Los resultados del observador₂ fueron semejantes: 42,9 y 85,8 micras, respectivamente (no mostrados). Estos valores son muy superiores a los obtenidos por los dos observadores para las medidas de la primera sesión. Sin embargo, como se observa claramente en la gráfica, las diferencias intersesión de las medidas del CRT en tres de los pacientes son iguales o superiores en valor absoluto a 30 micras, la magnitud que se puede estimar como clínicamente significativa. Esto indicaría que la variación del CRT en los tres pacientes no era debida a la variabilidad test-retest de las medidas sino que reflejaría un cambio real del espesor macular. Es evidente que la sensibilidad para detectar cambios dinámicos en la morfología de la retina mejora sustancialmente con la tecnología SD-OCT de Spectralis. Por otra parte, es obvio que para determinar la repetibilidad de las medidas de manera fiable, las dos sesiones han de realizarse en un corto intervalo (en nuestro caso, en el mismo día).

4.2.- VALORACIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL DE PACIENTES CONTROL Y CON DMAE INCIPIENTE TRAS FACOEMULSIFICACIÓN.

4.2.1.- RESULTADOS DEL EXAMEN PREOPERATORIO

Se reclutaron al inicio del estudio un total de 172 pacientes. Todos ellos habían sido remitidos a nuestro Centro para someterse a cirugía de cataratas en un período comprendido entre septiembre de 2009 y mayo de 2010. Se categorizó a los pacientes en dos grupos: un grupo con mácula normal (*grupo N*; 93 pacientes) y un grupo con DMAE incipiente (*Grupo Di*; 79 pacientes). Las características demográficas pueden observarse en la Tabla 4.3. Hay que destacar que tanto la media de edad como su desviación estándar fueron similares en ambos grupos, sin diferencias estadísticamente significativas. Todos los pacientes eran caucásicos, de ascendencia española.

Tabla 4.3.- Características demográficas, parámetros morfológicos y agudeza visual de los pacientes sometidos a cirugía de cataratas. Se indican las condiciones empleadas en la intervención quirúrgica. DE: desviación estándar.

CARACTERÍSTICAS	TOTAL PACIENTES (n = 172)	GRUPO MÁCULA NORMAL (n = 93)	GRUPO DMAE INCIPIENTE (n = 79)
Edad	75,2 (DE 9,2)	75,2 (DE 8,9)	75,2 (DE 9,7)
Sexo (mujeres)	103 (59,9%)	49 (52,7%)	54 (68,4%)
Raza blanca	100%	100%	100%
Grosor retiniano central (micras)	229,8 (DE 49,3)	229,5 (DE 29,6)	230,2 (DE 65,6)
Máxima altura macular preop. (micras)	341,2 (DE 44,6)	342,9 (DE 25,1)	339,0 (DE 60,1)
Agudeza visual (letras ETDRS)	63,3 (DE 12,4)	61,3 (DE 10,5)	65,1 (DE 11,9)
Técnica empleada: facoemulsificación	100%	100%	100%
Tiempo ultrasonidos efectivo durante facoemulsificación	17,87 (mín 0; máx 201)	16,78 (mín 0; máx 178)	19,16 (mín 0; máx 201)
Potencia media de ultrasonidos	14,62 (mín 0; máx 70)	14,93 (mín 0; máx 70)	14,25 (mín 0 ; máx 65)

La agudeza visual media preoperatoria fue ligeramente menor en el grupo de pacientes con DMAE con respecto al grupo con mácula normal (61,3 *versus* 65,1 letras ETDRS) aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

La valoración oftalmológica preoperatoria incluyó funduscopía con retinografía y OCT de dominio espectral con *scan* de seis cortes centrados en fóvea. Las exploraciones fueron realizadas por el mismo investigador el mismo día de la cirugía con el fin de acortar al máximo el período desde el examen hasta la intervención y evitar la posible aparición de NVC no detectada. Los sujetos del grupo *N* presentaban mácula normal en la exploración funduscópica y en la OCT. En los sujetos con DMAE incipiente se descartó la presencia de signos que pudieran sugerir NVC. Cuando había discrepancia entre el diagnóstico establecido por retinografía (normal) y por OCT (alterado), se tomó como referencia la prueba de OCT, atribuyendo la discordancia a artefactos en la retinografía debidos a opacidad de medios causada por la catarata.

Los valores de grosor retiniano central (CRT) medidos mediante OCT están reflejados en la Tabla 4.3. No existían diferencias estadísticamente significativas en los valores medios entre los pacientes con DMAE incipiente y los controles, aunque en el primer grupo, la dispersión fue mayor. Los valores de máxima altura macular (MAM) preoperatorios se muestran en la Tabla 4.3. En la Tabla 4.6 se ilustra la evolución de estos parámetros tras la cirugía.

Los resultados del examen preoperatorio del grupo *Di* se muestran en la Figura 4.3. Cabe reseñar que la presencia de catarata impedía la valoración adecuada macular hasta en un 17% de los pacientes de este grupo. Sin embargo, mediante la OCT, sólo en un 2% del grupo se obtuvieron imágenes no valorables por carecer de suficiente calidad debido a la intensa opacidad de medios.

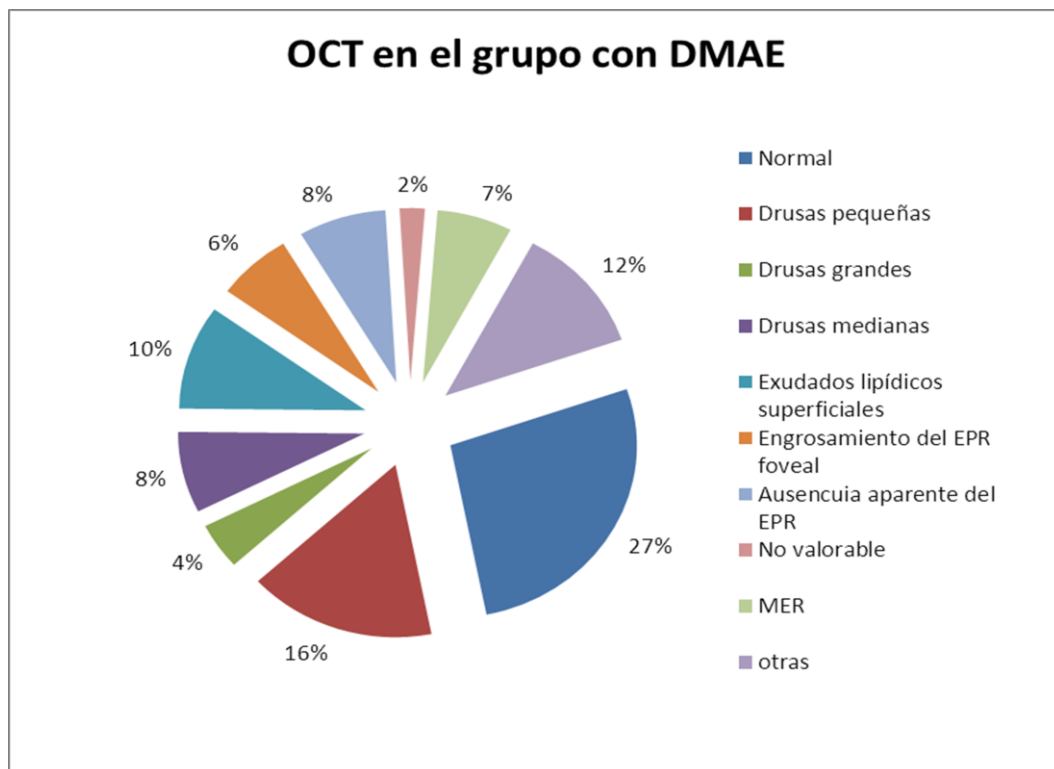
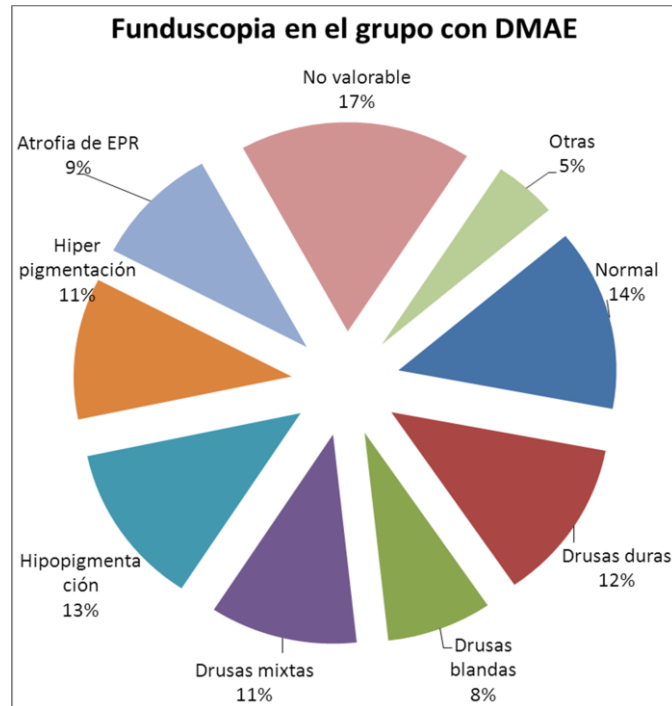


Figura 4.3.- Resultados del examen preoperatorio de los pacientes con DMAE incipiente (Grupo Di).

Durante la evaluación preoperatoria, un paciente del grupo *Di* (1/79) presentaba en la OCT signos indicativos de NVC (Figura 4.4), que no había sido diagnosticada previamente y que fue confirmada con AFG. Se canceló la cirugía de cataratas y entró en programa de tratamiento con *Lucentis*[®], con respuesta satisfactoria tanto en regresión de los signos tomográficos, como en mejoría visual.

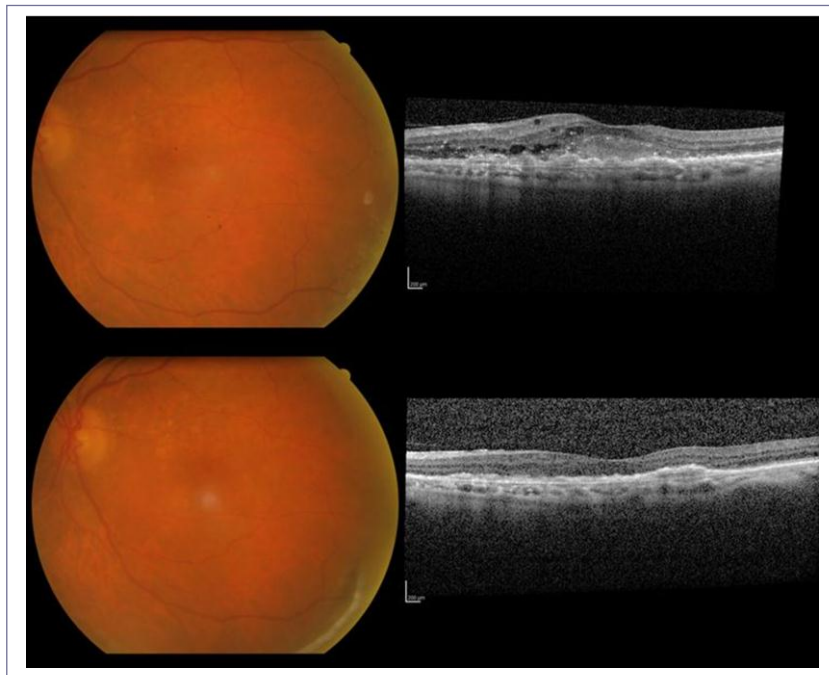


Figura 4.4.- Retinografía y OCT de un paciente asignado al grupo con DMAE incipiente. Parte superior: visita de *screening*. En la retinografía se observan drusas blandas y alteraciones pigmentarias leves del EPR. La tomografía muestra la membrana con fluido asociado. Parte inferior: tras dosis de carga con *Lucentis*[®] intravítreo. La retinografía no muestra cambios aparentes, mientras que en la tomografía se constata la regresión de la lesión.

A continuación se muestra una tabla de contingencia para relacionar las categorías retinográficas y tomográficas (Tabla 4.4) y se propone una tabla de contingencia (Tabla 4.5) que relaciona el diagnóstico dado por la retinografía (filas) con la imagen obtenida mediante OCT (columnas).

Tabla 4.4.- Tabla de contingencias diagnóstico retinografía *versus* OCT. Controles y casos. Datos recogidos en el examen preoperatorio. Filas: Retinografía (en rosa, controles; en verde, pacientes con alteraciones). Columnas: Tomografía.

		NORMAL	DRUSAS PEQUEÑAS	DRUSAS GRANDES	DRUSAS MEDIANAS	EX LIP SUP	ENGROS EPR	AUSENCIA EPR	NO VALORABLE	MER	OTRAS	TOTAL
NORMAL	Pacientes	85	0	0	0	0	0	0	0	0	2	87
	% sobre ret.	97,7									2,3	100
	% sobre oct	93,4									100	93,5
	% del total	91,4									2,2	93,5
NO VALORABLE		6	0	0	0	0	0	0	0	0		6
		100										100
		6,6										6,5
		6,5										6,5
TOTAL		91	0	0	0	0	0	0	0	0	2	93
		97,8									2,2	100
		100									100	100
		97,8									2,2	100
NORMAL		2	2	0	0	1	1	0	0	1	2	9
		22,2	22,2			11,1	11,1			11,1	22,2	100
		9,5	13,3			14,3	20,0			25,0	20,0	11,4
		2,5	2,5			1,3	1,3			1,3	2,5	11,4
DRUSAS DURAS		10	9	0	3	3	0	0	0	2	1	28
		35,7	32,1		10,7	10,7				7,1	3,6	100
		47,6	60		42,9	42,9				50	10	35,4
		12,7	11,4		3,8	3,8				2,5	1,3	35,4
DRUSAS BLANDAS		0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	5
				80	20							100
				100	14,3							6,3
				5,1	1,3							6,3
DRUSAS MIXTAS		0	2	0	3	0	0	0	0	0	1	6
			33,3		50						16,7	100
			13,3		42,9						10	7,6
			2,5		3,8						1,3	7,6
HIPOP		1	0	0	0	2	0	1	0	0	3	7
		14,3				28,6		14,3			42,9	100
		4,8				28,6		20			30	8,9
		1,3				2,5		1,3			3,8	8,9
HIPERP		4	1	0	0	0	1	0	0	0	1	7
		57,1	14,3				14,3				14,3	100
		19	6,7				20				10	8,9
		5,1	1,3				1,3				1,3	8,9
ATROFIA EPR		0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4
								100				100
								80				5,1
								5,1				5,1
NO VALORABLE		4	1	0	0	1	2	0	1	1	1	11
		36,4	9,1			9,1	18,2		9,1	9,1	9,1	100
		19	6,7			14,3	40		100	25	10	13,9
		5,1	1,3			1,3	2,5		1,3	1,3	1,3	13,9
OTRAS		0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
											50	100
											10	2,5
											1,3	2,5
TOTAL		21	15	4	7	7	5	5	1	4	10	79
		26,6	19	5,1	8,9	8,9	6,3	6,3	1,3	5,1	12,7	100
		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		26,6	19	5,1	8,9	8,9	6,3	6,3	1,3	5,1	12,7	100

Tabla 4.5.- Tabla de contingencias diagnóstico retinografía *versus* OCT para el total de la muestra en el examen preoperatorio.

		TOMOGRAFÍA		
		ANORMAL	NORMAL	
RETINOGRAFÍA	ANORMAL	51	25	76
	NORMAL	9	87	96
		60	112	172

Dadas las discordancias encontradas entre los dos métodos diagnósticos empleados, se calcularon los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para la retinografía. Estos valores para el grupo *Di* serían:

S= 87 %; E= 9,52 %; VPP= 72,85 %; VPN= 22,22 %.

Para el total de la muestra:

S= 85 %; E= 77,67 %; VPP= 67,1 %; VPN= 90,62 %.

En el examen postoperatorio al mes, para el grupo *Di*:

S= 89,47 %; E= 28,57 %; VPP= 77,27 %; VPN= 50%.

La cirugía de cataratas se llevó a cabo en todos los pacientes mediante facoemulsificación con implante de lente intraocular, anotando el tiempo total de ultrasonidos empleado, la potencia media de ultrasonidos (recogidos en la Tabla 4.3) y el tipo de lente implantada. Se produjeron complicaciones quirúrgicas en un paciente, perteneciente al grupo *N*. Así, concluyeron el estudio 78 pacientes del grupo *N* y 92 del grupo *Di*.

En 114 pacientes (67%), se realizó incisión convencional (2,2 mm); el facoemulsificador mayoritariamente empleado fue el Stellaris (134 pacientes, 78,8% de las cirugías), seguido del Infinity (26 cirugías, 15,29%). Para el resto de cirugías se utilizaron el Signature (6 pacientes, 3,5%), Millennium (3 casos, 1,7%), o Legacy (1 paciente, 0,5%). El modo *burst* de ultrasonidos

se utilizó en 58 procedimientos (34,1%). El tipo de lente más frecuentemente implantada fue la lente incolora Akreos (139 procedimientos, 81,7%). Rayner se implantó en 20 casos (11,7%), Tecnis en cinco casos (2,9%) y Quatrix en dos casos (1,2%). En cuatro pacientes (2,3% de los casos) se implantó la lente con filtro amarillo AcrySof IQ.

4.2.2.- EVOLUCIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL POSTOPERATORIA AL MES Y AL AÑO

Al mes de la cirugía se revisó a todos los pacientes. No hubo pérdidas en el seguimiento para esta primera visita postoperatoria. La agudeza visual fue igual o superior a 69 letras ETDRS (equivalente Snellen 0,5) en el 90,7% de los pacientes. Ningún paciente sufrió pérdida de visión como consecuencia de la intervención.

En todos los casos, se repitieron la retinografía y la OCT. Para la OCT se empleó el modo de seguimiento, tomando como referencia la exploración preoperatoria. Al eliminar la catarata, ninguna de las imágenes tomográficas se consideró como “no valorable”. Cuando la exploración mostraba cualquier signo sugerente de DMAE exudativa, se realizó AFG. Fue necesaria en tres pacientes y resultó negativa para ese diagnóstico en todos los casos. (Figura 4.5)

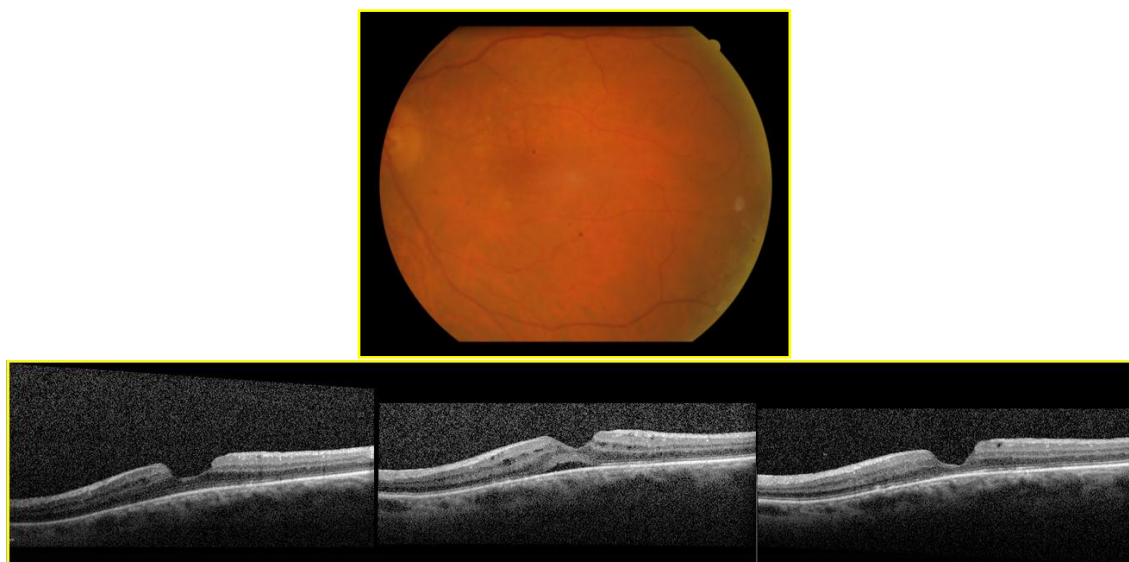


Figura 4.5.- Retinografía y OCT de un paciente que requirió AFG. Desde la imagen preoperatoria (abajo, izquierda) se producen alteraciones con acúmulo de líquido (centro). La AFG descartó NVC. Se instauró tratamiento diurético con mejoría (abajo, derecha).

Se detectó edema macular postquirúrgico en tres pacientes (1,74%), dos de ellos pertenecientes al grupo *Di* y uno al grupo *N*. El grosor retiniano central medido mediante OCT fue, respectivamente, de 208, 262 y 470 micras antes de la cirugía y 337, 313 y 549 micras un mes después de la operación. Todos ellos notaron mejoría en su visión después de la cirugía a pesar del edema. Se decidió observación en dos de ellos y tratamiento en el otro con ketorolaco. Ningún paciente, pues, presentó DMAE exudativa al mes de la cirugía de cataratas, ni en el grupo *N* ni en el grupo *Di*.

Tras esta primera visita, ninguno de los pacientes acudió al Servicio por haber detectado pérdida de visión.

En el período de seguimiento a un año se registraron nueve pérdidas (5,2%), tres en el grupo *N* y 6 en el grupo *Di* por diferentes motivos: comienzo de tratamiento oncológico (2 casos), fallecimiento (1), accidente cerebrovascular severo con afectación de la movilidad (1), emigración a otro país (1) y causa desconocida por imposibilidad de establecer contacto (4).

Doce meses después de la cirugía, el edema postquirúrgico presente en algunos pacientes al mes de la intervención estaba resuelto en todos los casos. Se detectaron en el grupo control dos casos de opacidad capsular significativa con disminución importante de la agudeza visual, que precisaron tratamiento con láser YAG (< 2%). Ninguno de los pacientes había solicitado atención oftalmológica por esa disminución.

La agudeza visual a los doce meses de la cirugía era igual o superior a 69 letras en el 92,8% de los ojos. Este parámetro mejoró dos o más líneas ETDRS en el 91,4% de los ojos. Ninguno de los ojos a estudio experimentó tras la cirugía una pérdida mayor de una línea. La ganancia fue mayor en los pacientes sin DMAE asociada (12,3 letras *versus* 6,2, $p < 0,05$). Con respecto a la revisión a un mes tras la cirugía, en el 77% de los ojos, la agudeza visual era similar (de cinco letras menos a cinco letras más) a la registrada un año después. Un 10,5% mejoraron su visión a lo largo del primer año respecto de la primera revisión postquirúrgica, en probable relación con la graduación definitiva, entre otros factores. En un 12,5%, la visión decayó, siendo la opacidad capsular posterior el motivo en todos los casos.

La exploración mediante retinografía no mostró cambios detectables entre las imágenes correspondientes a la visita del mes y la del año. No fue necesario realizar ninguna angiografía. Por otra parte, las imágenes obtenidas con la OCT se mantuvieron prácticamente idénticas en todos los pacientes, salvo en cuatro, todos ellos pertenecientes al grupo Di. Tres de ellos desarrollaron un agujero lamelar (Figura 4.6 A). En otro apareció un nuevo desprendimiento drusenoide del EPR de pequeño tamaño (Figura 4.6 B). Es interesante destacar que esta paciente (intervenida en su ojo derecho que fue el incluido en este estudio), también fue operada de cataratas en el ojo adelfo y se pudo constatar en el seguimiento que en este segundo ojo, una zona de EPR muy sobreelevada tuvo la evolución justo invertida respecto al primer ojo (Figura 4.6 C).

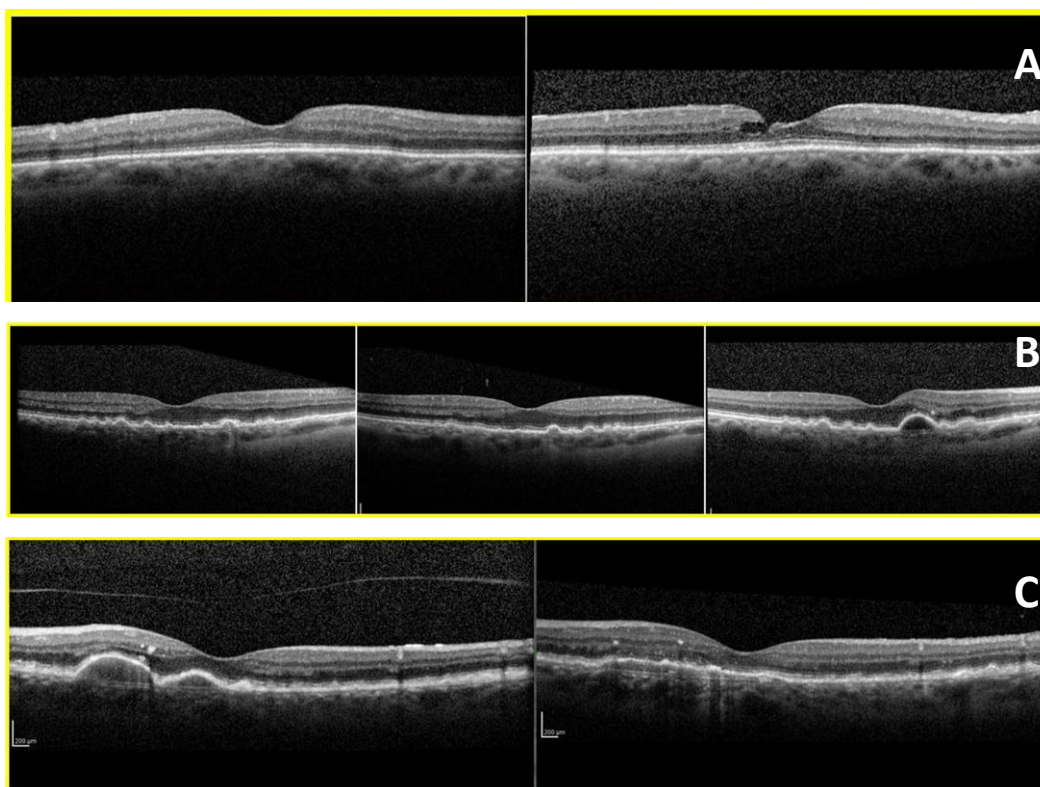


Figura 4.6.- Imágenes tomográficas que muestran la presencia de alteraciones maculares en dos pacientes del grupo Di. A) Agujero lamelar a los 12 meses de seguimiento. B) Desprendimiento drusenoide de pequeño tamaño en una paciente. C) Regresión de drusas en el ojo adelfo de la misma paciente.

Ningún paciente presentó signos de neovascularización coroidea al año de la cirugía de cataratas.

La Tabla 4.6 muestra los valores de cuantificación macular tomográfica a lo largo del seguimiento. Se ha aplicado la *t* de Student para datos apareados para comparar el espesor retiniano central en los tres tiempos de examen para el total de la muestra. De forma análoga, se han analizado los valores de máxima altura macular. Los resultados se han representado gráficamente para mostrar la evolución de los parámetros (Figura 4.7)

Tabla 4.6.- Parámetros tomográficos de los grupos de pacientes en el preoperatorio, al mes y a los 12 meses de seguimiento. Abreviaturas: CRT, espesor retiniano central; MAM, máxima altura macular.

	Total pacientes	Grupo N	Grupo Di
CRT preop	229,1 (48,6)	229,5 (29,6)	230,2 (65,6)
MAM preop	340,1 (42,7)	343,0 (25,1)	339,6 (60,5)
CRT al mes	236,6 (53,9)	236,1 (32,7)	237,9 (68,3)
MAM al mes	350,9 (40,2)	349,6 (30,5)	352,5 (50,3)
CRT al año	232,1 (47,7)	233,2 (32,6)	227,7 (62,3)
MAM al año	352,3 (33,2)	350,7 (31,0)	354,3 (36,0)

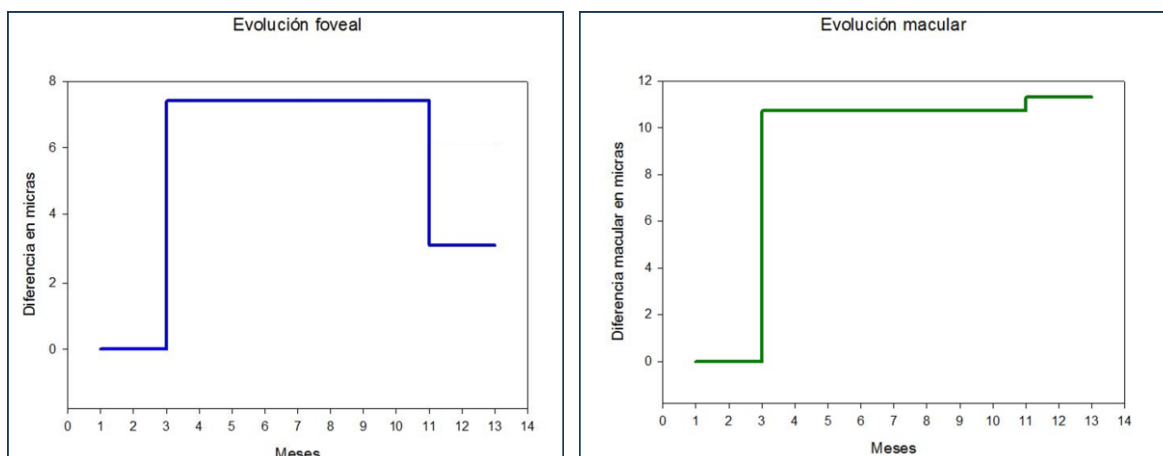


Figura 4.7.- Evolución del grosor retiniano central y de la máxima altura macular tras cirugía de cataratas.

Para el grosor retiniano central de la muestra, la medida al mes tras la cirugía arrojaba un valor medio 7,4 micras mayor que en el tiempo preoperatorio ($p < 0,05$). Desde el mes, hasta el año, decrecía 6,3 micras de media por lo que la diferencia entre el estado al inicio y al final del estudio no fue significativa ($p = 0,58$). Respecto a la máxima altura macular, el valor al

mes de la intervención era 10,7 micras mayor que al inicio del estudio ($p < 0,001$) y prácticamente se mantenía estable hasta el final del estudio (diferencia de 0,09 micras; $p = 0,96$, no significativa).

Así, de nuestros resultados se deduce que la cirugía de cataratas mediante facoemulsificación no supone un factor de riesgo para el desarrollo de neovascularización coroidea, ni en sujetos con mácula normal ni en aquellos que presentaban DMAE incipiente en el momento de la intervención, al menos hasta un año después de la intervención quirúrgica. La agudeza visual mejoró al mes de la intervención quirúrgica en los dos grupos de pacientes y se mantuvo estable tras un año de seguimiento.

4.3.- ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS Y402H (GEN *CFH*) Y A69S (GEN *LOC387715/ARMS2*) CON LA DMAE NEOVASCULAR EN PACIENTES DE LA COMUNIDAD DE MADRID

Esta investigación se llevó a cabo con 117 controles y 103 pacientes que presentaban DMAE neovascular, según queda detallado en la sección de Material y Métodos. En cuanto a los pacientes con DMAE, fueron reclutados entre aquellos que recibían tratamiento en la Unidad de Mácula de acuerdo con los criterios expuestos en la sección 3.1.2.2. Las características clínicas de los pacientes con DMAE y los sujetos control se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7.- Características de los pacientes con DMAE y los sujetos control.

Características	Pacientes con DMAE (n = 103)	Controles sanos (n = 117)
Edad		
Intervalo	62- 93	56-92
Media (DE)	80,3 (7,05)	78,3 (7,2)
Sexo, N° (%)		
Varones	41 (39,8)	50 (42,7)
Mujeres	62 (60,2)	67 (57,3)
DMAE neovascular, N° (%)		
Típica	79 (76,7)	NA
VCP	4 (3,9)	NA
RAP	20 (19,4)	NA
Neovascularización bilateral, N° (%)	60 (58,2)	NA

DMAE, degeneración macular asociada a la edad. En la DMAE neovascular típica se han incluido las formas clásica, predominantemente clásica, mínimamente clásica, parcialmente clásica y oculta. VCP, vasculopatía coroidea polipoidea; RAP, proliferación angiomasiosa retiniana; NA, no aplicable.

En todos los participantes en el estudio se llevó a cabo el análisis genético de los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2*. Este último no pudo ser determinado en uno de los pacientes. Las frecuencias de los genotipos respecto a cada uno de los polimorfismos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en los controles ($p = 0,757$ para Y402H; $p = 0,603$ para A69S) como en los casos ($p = 0,571$ para Y402H; $p = 0,721$ para

A69S) (Tabla 4.8). La frecuencia de ambos alelos de riesgo (1277C y 270T) fue significativamente mayor en los pacientes con DMAE que en los controles (0,519 vs 0,308 y 0,426 vs 0,154, respectivamente).

Tabla 4.8.- Frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos Y402H (CFH) y A69S (LOC387715/ARMS2) en sujetos control y pacientes con DMAE neovascular.

SNP (Gen)	Alelo	Frecuencia	Genotipo	n	Frecuencia		χ^2	p (EHW)
					Observada	Esperada		
Y402H (CFH)								
Controles	T	0,692	TT	55	0,470	0,479	0,096	0,757
	C	0,308	TC	52	0,444	0,426		
			CC	10	0,085	0,095		
DMAE	T	0,481	TT	22	0,214	0,231	0,312	0,571
	C	0,519	TC	55	0,534	0,499		
			CC	26	0,252	0,270		
A69S (LOC387715/ARMS2)								
Controles	G	0,846	GG	83	0,709	0,716	0,096	0,603
	T	0,154	GT	32	0,274	0,260		
			TT	2	0,017	0,024		
DMAE	G	0,574	GG	35	0,343	0,329	0,128	0,721
	T	0,426	GT	47	0,461	0,489		
			TT	20	0,196	0,182		

n, número de sujetos en cada categoría; EHW, equilibrio de Hardy-Weinberg. Para evaluar las diferencias estadísticas de las frecuencias alélicas entre los pacientes de DMAE y los controles se empleó el test de Chi-cuadrado.

En la Tabla 4.9 se muestra la distribución de los genotipos y alelos para los polimorfismos Y402H y A69S en los controles y pacientes con DMAE neovascular. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los genotipos del grupo DMAE y el grupo control con respecto a ambos polimorfismos.

Tabla 4.9.- Distribución genotípica y alélica de los polimorfismos Y402H (rs1061170) y A69S (rs10490924) en controles y pacientes con DMAE neovascular.

SNP (<i>Gen</i>)	Controles (n = 117) Nº (%)	DMAE (n = 103) Nº (%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%) ^{a,b}	Valor de <i>p</i> ^{a,b}
Y402H (CFH)					
Genotipos			< 0,001		
TT	55 (47,0%)	22 (21,4%)		1 ^c	
TC	52 (44,4%)	55 (53,4%)		2,64 (1,42-4,93) ^a	0,002 ^a
CC	10 (8,5%)	26 (25,2%)		6,50 (2,69-15,69) ^a	<0,001 ^a
TC + CC	62 (53,0%)	81 (78,6%)		3,26 (1,80-5,92) ^a	<0,001 ^a
Alelos			<0,001		
T	162 (69,2%)	99 (48,1%)		1 ^c	
C	72 (30,8%)	107 (51,9%)		2,43 (1,65-3,59) ^a	<0,001 ^a
A69S (LOC387715/ARMS2)					
Genotipos			<0,001		
GG	83 (70,9%)	35 (34,3%)		1 ^c	
GT	32 (27,4%)	47 (46,1%)		3,48 (1,92-6,33) ^b	<0,001 ^b
TT	2 (1,7%)	20 (19,6%)		23,71 (5,26-106,95) ^b	<0,001 ^b
GT + TT	34 (29,1%)	67 (65,7%)		4,67 (2,64-8,27) ^b	<0,001 ^b
Alelos			<0,001		
G	198 (84,6%)	117 (57,4%)		1 ^c	
T	36 (15,4%)	87 (42,6%)		4,08 (2,61-6,41) ^b	<0,001 ^b

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza; EHW, equilibrio de Hardy-Weinberg. Diferencias significativas: $p < 0,05$

^a: Genotipos TC, CC y TC + CC vs TT; Alelo C vs T

^b: Genotipos GT, TT y GT + TT vs GG; Alelo T vs G

^c: Genotipo o alelo de referencia

El alelo de riesgo C fue significativamente ($p < 0,001$) más frecuente en el grupo DMAE (51,9%) que en el grupo control (30,8%) y el valor calculado para el parámetro *odds ratio* (OR) fue 2,43 (intervalo de confianza [IC] 95%, 1,65-3,59; $p < 0,001$). Asimismo, la distribución de los genotipos presentaba diferencias significativas entre ambos grupos. El genotipo TT estaba

presente en un 47% de los controles y en un 21,4% de los pacientes. Sin embargo, el genotipo CC se halló sólo en un 8,5% de los controles, mientras que este porcentaje alcanzaba un 25% en los pacientes afectados por DMAE. El polimorfismo incrementa el riesgo para la DMAE neovascular tanto en heterocigosis (OR = 2,64; IC 95%, 1,42-4,93; $p = 0,002$) como en homocigosis (OR = 6,5; IC 95%, 2,69-15,69; $p < 0,001$).

También se hallaron diferencias significativas entre los dos grupos con respecto al polimorfismo A69S. La frecuencia del alelo de riesgo T estaba significativamente ($p < 0,001$) incrementada en el grupo de pacientes (42,6%,) con respecto al control (15,4%) y la OR calculada fue 4,08 (IC 95%, 2,61-6,41; $p < 0,001$). Es llamativo que el genotipo TT se encontró sólo en el 1,7% del grupo control, mientras que estaba presente en el 19,6% de los pacientes con DMAE ($p < 0,001$). Nuestros datos muestran una correlación ($p < 0,001$) entre el SNP en homocigosis y la DMAE neovascular (OR = 23,71; IC 95%, 5,26-106,95; $p < 0,001$). El polimorfismo también confiere un riesgo importante en heterocigosis (OR = 3,48; IC 95%, 1,92-6,33; $p < 0,001$).

Estos resultados confirman la asociación de los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* con la DMAE neovascular, siendo este último el que mostró el aumento de riesgo más importante cuantitativamente. En la muestra estudiada, los pacientes tenían una probabilidad 3,26 veces mayor de portar una copia del alelo de riesgo C para Y402H con respecto a los controles ($p = 0,001$) y una probabilidad 4,08 veces mayor de portar una copia del alelo de riesgo T para A69S ($p = 0,001$).

También se han evaluado los efectos combinados de las variantes de *CFH* y *LOC387715/ARMS2* para los dos polimorfismos analizados con éxito en la totalidad de los controles y en 102 de los pacientes con DMAE. Como se observa en la Tabla 4.10, en el grupo control había 38 sujetos (32,5%) que eran dobles homocigoto para el genotipo *wild type* pero ninguno de los 117 controles resultó ser doble homocigoto para los alelos de riesgo de los dos polimorfismos. Sin embargo, en el grupo DMAE, solo siete pacientes (6,8%) eran dobles homocigotos para el genotipo *wild type*, mientras que cuatro (3,9%) resultaron ser dobles homocigotos para los alelos de riesgo. Las combinaciones de alelos más frecuentes entre los controles fueron doble homocigoto *wild type* (32,5%), y heterocigoto para Y402H +

homocigoto *wild type* para A69S (32,5%). Entre los pacientes con DMAE, la combinación más frecuente fue heterocigoto para ambos polimorfismos (27,5%) y la menos frecuente, los dobles homocigotos de riesgo (3,92%).

Tabla 4.10.- Valoración de los efectos combinados de las variantes de *CFH* Y402H y *LOC387715/ARMS2* A69S.

Grupo	Combinación genotipos	Genotipos de <i>CFH</i> y <i>ARMS2</i>	G. DMAE	G. Control	OR	IC 95%	p	Nº alelos de riesgo
			(n=102)	(n=117)				
			Nº (%)	Nº (%)				
1	<i>CFH</i> -/- <i>ARMS2</i> -/-	TT/GG	7 (6,86)	38 (32,5)	1,00	-	-	0
2	<i>CFH</i> -/- <i>ARMS2</i> +/-	TT/GT	8 (7,84)	15 (12,8)	2,89	0,89-9,40	0,120	1
	<i>CFH</i> -/- <i>ARMS2</i> +/+	TT/TT	7 (6,86)	2 (1,71)	18,99	3,25-111,12	0,001	2
3	<i>CFH</i> +/- <i>ARMS2</i> -/-	TC/GG	18 (17,6)	38 (32,5)	2,57	0,96-6,87	0,066	1
	<i>CFH</i> +/+ <i>ARMS2</i> -/-	CC/GG	10 (9,8)	7 (5,98)	7,75	2,20-27,29	0,001	2
4	<i>CFH</i> +/- <i>ARMS2</i> +/-	TC/GT	28 (27,5)	14 (12)	10,85	3,88-30,42	<0,001	2
	<i>CFH</i> +/- <i>ARMS2</i> +/+	TC/TT	9 (8,82)	0 (0)	97,53	-	<0,001	3
	<i>CFH</i> +/+ <i>ARMS2</i> +/-	CC/GT	11 (10,8)	3 (2,56)	19,90	4,04-70,45	<0,001	3
5	<i>CFH</i> +/+ <i>ARMS2</i> +/+	CC/TT	4 (3,92)	0 (0)	46,20	-	0,002	4

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza.

Es interesante observar que en los homocigotos *wild type* para el gen *LOC387715/ARMS2* (GG), la presencia de uno o dos alelos C del gen *CFH* incrementa el riesgo para DMAE 2,57 y 7,75 veces. Sin embargo, en los homocigotos *wild type* para el gen *CFH* (TT), la presencia de uno o dos alelos T del gen *LOC387715/ARMS2* aumenta el riesgo para DMAE 2,89 y 18,99 veces. En los homocigotos para el alelo de riesgo (CC), un único alelo T del gen *LOC387715/ARMS2* supone un aumento de la OR hasta 19,9. Esto indica que el alelo 270T contribuye a incrementar el riesgo para la DMAE en mayor medida que el alelo 1277C. El hecho de que los genotipos [*CFH* +/- *ARMS2* +/+] y [*CFH* +/+ *ARMS2*+/+] no se encontraran en la muestra de sujetos control es coherente con esta idea, aunque no permite calcular correctamente los valores de OR (IC).

4.4.- INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS Y402H (GEN *CFH*) Y A69S (GEN *LOC387715/ARMS2*) SOBRE LA RESPUESTA FUNCIONAL AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB

4.4.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO

En este estudio (**E3**) se ha valorado la influencia del genotipo respecto a los polimorfismos Tyr402His (rs1061179) y Ala69Ser (rs10490924) de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2*, respectivamente, sobre la respuesta funcional y de la anatomía macular de 103 pacientes diagnosticados de DMAE exudativa y tratados exclusivamente mediante inyecciones intravítreas de ranibizumab. Se aplicó el protocolo de tratamiento aprobado por la Sociedad Española de Retina y Vítreo. La estrategia empleada combinó una dosis de carga consistente en una inyección mensual del agente antiangiogénico (0.5 mg/0.05 ml) durante tres meses y retratamiento de acuerdo con el protocolo PRN, según ha sido descrito en el apartado de Material y Métodos.

Los sujetos participantes en el estudio fueron seleccionados de forma que constituyeran una muestra representativa de los perfiles de respuesta a ranibizumab en la práctica clínica para poder estudiar posteriormente si existía una asociación entre los mencionados polimorfismos y variables bien definidas. Para ello, se establecieron tres categorías: perfil de respuesta ideal, perfil dependiente y perfil resistente. En general, estas categorías están dirigidas por la impresión clínica del facultativo que hizo el seguimiento y tratamiento de los pacientes y no están definidas por criterios estrictos. La categoría “*ideal*” comprendió aquellos pacientes que no necesitaron más inyecciones una vez terminada la dosis de carga en un período de seguimiento mínimo de doce meses. Se incluyeron también en esta categoría algunos pacientes que requirieron reinyecciones ocasionales según los criterios de tratamiento utilizados. Estos últimos eran pacientes con buen mantenimiento de la agudeza visual en las visitas, que recuperaban la agudeza visual perdida tras el retratamiento y con relativa buena conservación del estado macular. La categoría “*dependiente*” estaba formada por aquellos pacientes que alternaban visitas en las que manifestaban estabilidad, con visitas en las que precisaban retratamiento. Los pacientes

considerados “resistentes” eran aquellos que precisaban inyecciones muy frecuentes o prácticamente mensuales en función de los criterios de retratamiento aplicados.

Aplicando estos criterios se consiguió una muestra en la que están bien representados los tres perfiles: 33 pacientes (32%) con perfil de respuesta ideal, 35 (34%) con perfil dependiente y 35 (34%) con perfil resistente. Dado que el seguimiento supera en el 88,3% de los casos los doce meses, se ha considerado la tendencia de comportamiento. Un paciente que comienza el estudio como ideal y pasados doce meses se comporta como dependiente, se ha considerado dependiente. Para haber sido ideal, debe haber mantenido su comportamiento a lo largo de todo el seguimiento disponible. Esta categoría estaría pobremente representada en un reclutamiento consecutivo de pacientes en consulta. Las características de los pacientes al diagnóstico se recogen en la Tabla 4.11. Cabe señalar que ninguno de ellos había recibido otro tipo de tratamiento previo en el ojo a estudio. Estaban operados de cataratas 45 pacientes, en los que la intervención se realizó como mínimo seis meses antes del diagnóstico.

La agudeza visual se registró como letras ETDRS. Al diagnóstico, 6 pacientes tenían una agudeza en el ojo a estudio entre 80 y 90 letras, 20 ojos entre 70 y 79, 31 ojos entre 60 y 69, 21 ojos entre 50 y 59, 13 entre 40 y 49 y 12 pacientes menos de 40 letras (Figura 4.8). El valor medio fue de $58,8 \pm 14,8$ letras.

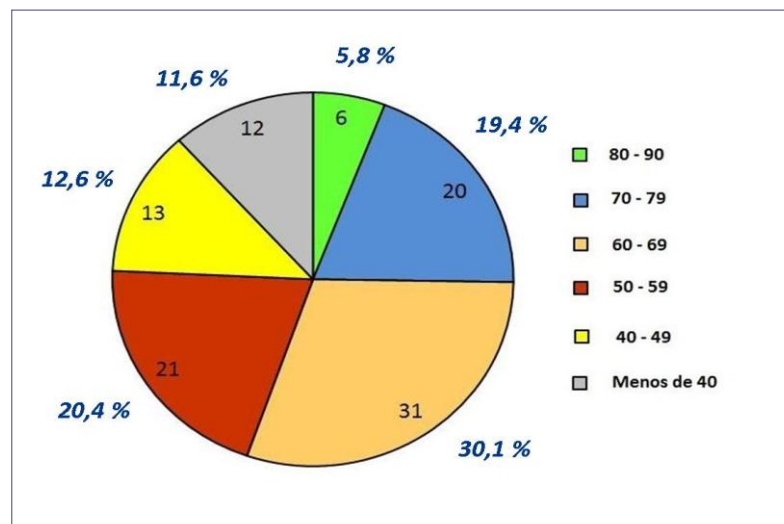


Figura 4.8.- Agudeza visual en letras ETDRS al diagnóstico en la muestra de 103 pacientes con DMAE neovascular.

Tabla 4.11.- Características de los pacientes con DMAE neovascular al momento del diagnóstico.

Características	Pacientes con DMAE neovascular (N = 103)
Edad, Años	
Intervalo	62- 93
Media \pm DE	80,3 \pm 7,05
Grupos de edades, N° (%)	
60-69	14 (13,6)
70-79	52 (50,5)
80-89	31 (30,1)
\geq 90	6 (5,8)
Sexo, N° (%)	
Varones	41 (39,8)
Mujeres	62 (60,2)
Tratamiento previo para DMAE, N° (%)	
Ninguno	103 (100)
Afectación, N° (%)	
Bilateral	60 (58,2)
Unilateral	43 (41,8)
Ojo a estudio, N° (%)	
Derecho	53 (51,5)
Izquierdo	50 (48,5)
Antecedentes oftalmológicos, N° (%)	
Fáquicos)	58 (56,3)
Pseudofáquicos*	45 (43,7)
Hábito tabáquico, N° (%)	
Fumadores	12 (11,6)
No fumadores	54 (52,4)
Ex-fumadores	37 (35,9)
Agudeza visual (letras ETDRS)	
Mínima	17
Máxima	90
Media \pm DE	58,8 \pm 14,8

* La cirugía de cataratas no se había realizado en ningún paciente en los 6 meses previos al diagnóstico.

Las lesiones fueron clasificadas por su comportamiento angiográfico en neovascularización oculta, mínimamente clásica, una categoría que integra los tipos clásica, predominantemente clásica y parcialmente clásica (para no subdividir la muestra excesivamente), RAP y VCP. Los diagnósticos más frecuentes fueron neovascularización oculta, la categoría mixta y las lesiones tipo RAP (Figura 4.9). En cuanto a la localización de las lesiones, 69 eran subfoveales (67%), 29 yuxtafoveales (28%) y 5 (5%) eran extrafoveales.

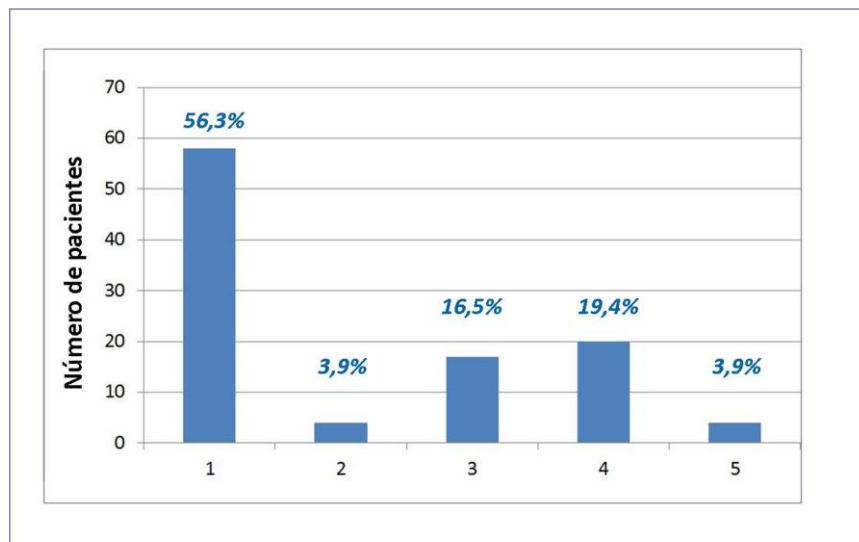


Figura 4.9.- Distribución de tipos de lesión en la muestra (clasificación angiográfica). 1: oculta; 2: mínimamente clásica; 3: clásica + predominantemente clásica + parcialmente clásica; 4: RAP; 5: VCP.

El seguimiento de los pacientes desde el momento del diagnóstico del ojo incluido a estudio hasta el momento de la recogida de datos se hizo desde 2006 en 3 pacientes (2,9%), desde 2007 en 26 pacientes (25,24%), desde 2008 en 26 pacientes (25,24%), desde 2009 en 27 pacientes (26,21%) y desde 2010 en 21 pacientes (20,38%). Todos los pacientes completaron un seguimiento mínimo de doce meses.

4.4.2.- RESULTADOS FUNCIONALES TRAS LA DOSIS DE CARGA CON RANIBIZUMAB

La dosis de carga se realizó con tres inyecciones mensuales sucesivas. Al mes después de la tercera inyección, la agudeza visual media aumentó significativamente con respecto al valor hallado al diagnóstico ($66,9 \pm 12,6$ vs $58,8 \pm 14,8$ letras; $p < 0.001$). Sin embargo, la respuesta individual de los pacientes era muy variable como muestra la Figura 4.10. Un 88,3% de los pacientes evitó la pérdida de agudeza visual durante esta fase. El grupo más numeroso

estaba compuesto por los pacientes que ganaban 15 o más letras ETDRS (27,2%). Le seguía en frecuencia el de pacientes en los que se estimó que no había cambio (tomando la ganancia y la pérdida de hasta cuatro letras dentro de esta categoría) y aquellos en los que la ganancia era discreta. Los pacientes que perdieron agudeza visual, en su mayoría de cinco a nueve letras, suponen un 11,7% de la muestra.

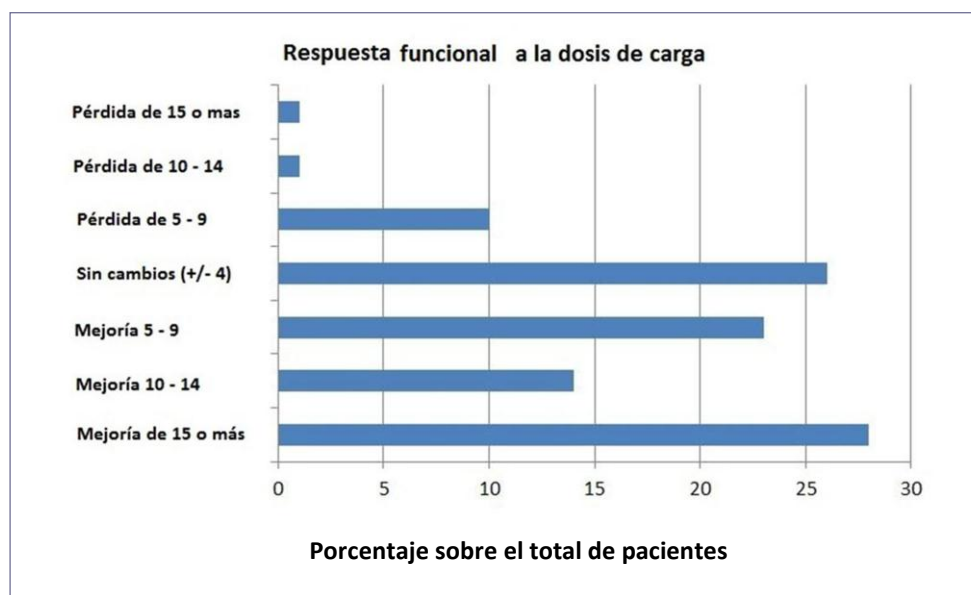


Figura 4.10.- Patrones de respuesta en términos de agudeza visual tras completar la dosis de carga con ranibizumab (0,5 mg/inyección).

El número medio de letras recuperadas tras la dosis de carga fue 8,19 para toda la muestra pero el efecto beneficioso sobre la recuperación de la agudeza visual se puede atribuir a las dos primeras inyecciones (5,45 y 3,07 letras ETDRS respectivamente). La tendencia desaparece con la tercera inyección, observándose un leve retroceso no significativo en la agudeza visual, tanto en valores representados como mediana (Figura 4.11), como cuando los valores se presentan como media (Tabla 4.12).

Se investigó si había una relación entre la cantidad de letras recuperadas por los pacientes con la dosis de carga y la agudeza visual con que partían al diagnóstico. Para ello, se dividió la muestra en tres grupos en función de la agudeza visual al diagnóstico: pacientes con visión igual o mayor de 70 letras (grupo A, 26 pacientes), aquellos con visión entre 50 y 69 letras (grupo B con 46 pacientes) y pacientes con visión igual o menor a 50 letras (grupo C con 31 pacientes). Luego se calculó la mediana de la mejoría en letras ETDRS en cada uno de estos grupos. Se trabajó con medianas en vez de medias por ser las desviaciones estándar elevadas.

Los valores obtenidos fueron: 1,76 letras en el grupo A, 6,8 en el grupo B y 15,64 en el grupo C. La prueba de la mediana para muestras independientes reveló que todas las diferencias entre grupos eran significativas (Figura 4.12).

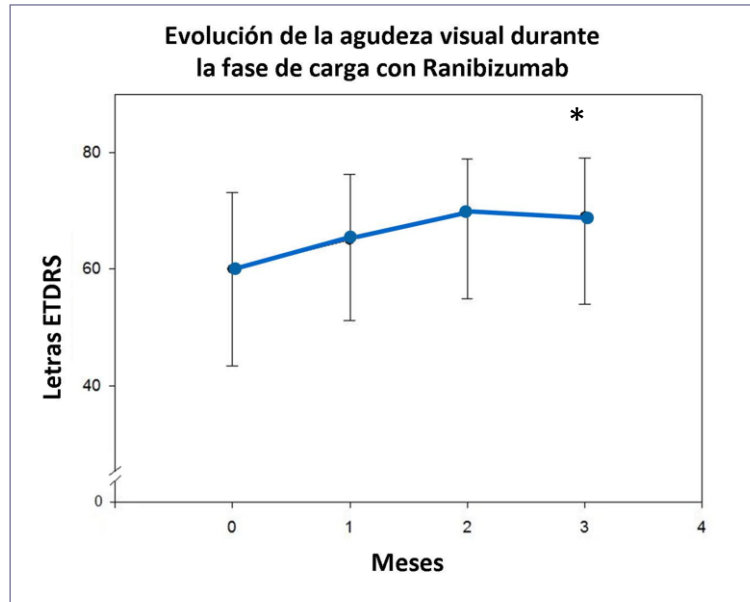


Figura 4.11.- Cambio en la agudeza visual (medianas) a lo largo de la fase de carga con ranibizumab intravítreo. Se observa tendencia ascendente los dos primeros meses del tratamiento. Las líneas verticales representan desviaciones estándar. * $p < 0,001$, agudeza visual al final de la fase de carga vs agudeza inicial.

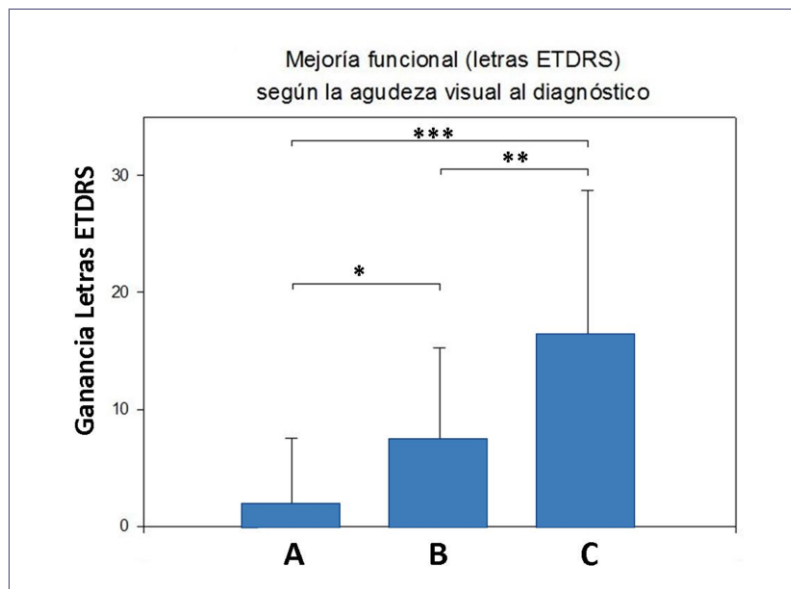


Figura 4.12.- Ganancia en letras ETDRS tras completar la dosis de carga con ranibizumab en función de la agudeza visual al diagnóstico. Se representa la mediana para cada uno de los tres grupos en que se dividió la muestra de pacientes según su visión antes de comenzar el tratamiento: A, ≥ 70 letras; B, 50-69 letras; C, ≤ 50 letras. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,00001$.

4.4.3.- RESULTADOS TRAS SEGUIMIENTO A UNO, DOS Y TRES AÑOS

La Figura 4.13 A muestra la evolución de la agudeza visual durante el primer año de seguimiento para el número total de pacientes. Se observa que el valor alcanzado tras la dosis de carga se mantiene prácticamente constante al finalizar el período de seguimiento. El número medio de letras ETDRS recuperadas fue 7,7 (DE 12,8) para toda la muestra, sin diferencias significativas con la ganancia media tras la dosis de carga (8,19, DE 10,8). Del total de los pacientes, un 74,5% recuperó agudeza visual y un 29,1% ganó 15 o más letras.

Se ha analizado la relación entre la agudeza visual al final del primer año y al diagnóstico. A partir de los resultados obtenidos, que se presentan en la Figura 4.13 B, se propone un modelo de regresión lineal para la agudeza visual al final del primer año (AV-12) en función de la agudeza visual al diagnóstico (AVdx), según la ecuación:

$$AV-12 = 38,5312 + 0,476026 * AVdx$$

Un 32,6% de la agudeza visual final a los 12 meses de tratamiento puede explicarse a partir de la inicial.

Se ha llevado a cabo el seguimiento de una parte de la muestra inicial de pacientes durante 24 meses y 36 meses. Aunque el número de sujetos es más reducido, en particular en el seguimiento a tres años (n = 54), los resultados son interesantes porque permiten evaluar la eficacia a largo plazo del tratamiento con ranibizumab en régimen PRN. Hay que señalar que el estudio PrONTO, una referencia para este protocolo de administración, incluyó durante el primer año de seguimiento a 40 pacientes²²⁸, 37 de los cuales completaron el segundo año²²⁹. La Figura 4.14 muestra la evolución de agudeza visual en el subgrupo de 90 pacientes en los que se completó el seguimiento a 24 meses y análogamente, para los 54 pacientes en los que se realizó un seguimiento a 36 meses. Hay que mencionar que la proporción de perfiles de respuesta en este último subgrupo se mantuvo equilibrada: 22 pacientes presentaban el perfil *ideal* de respuesta, 13 correspondían al tipo *dependiente* y 19 de ellos eran de tipo *resistente*.

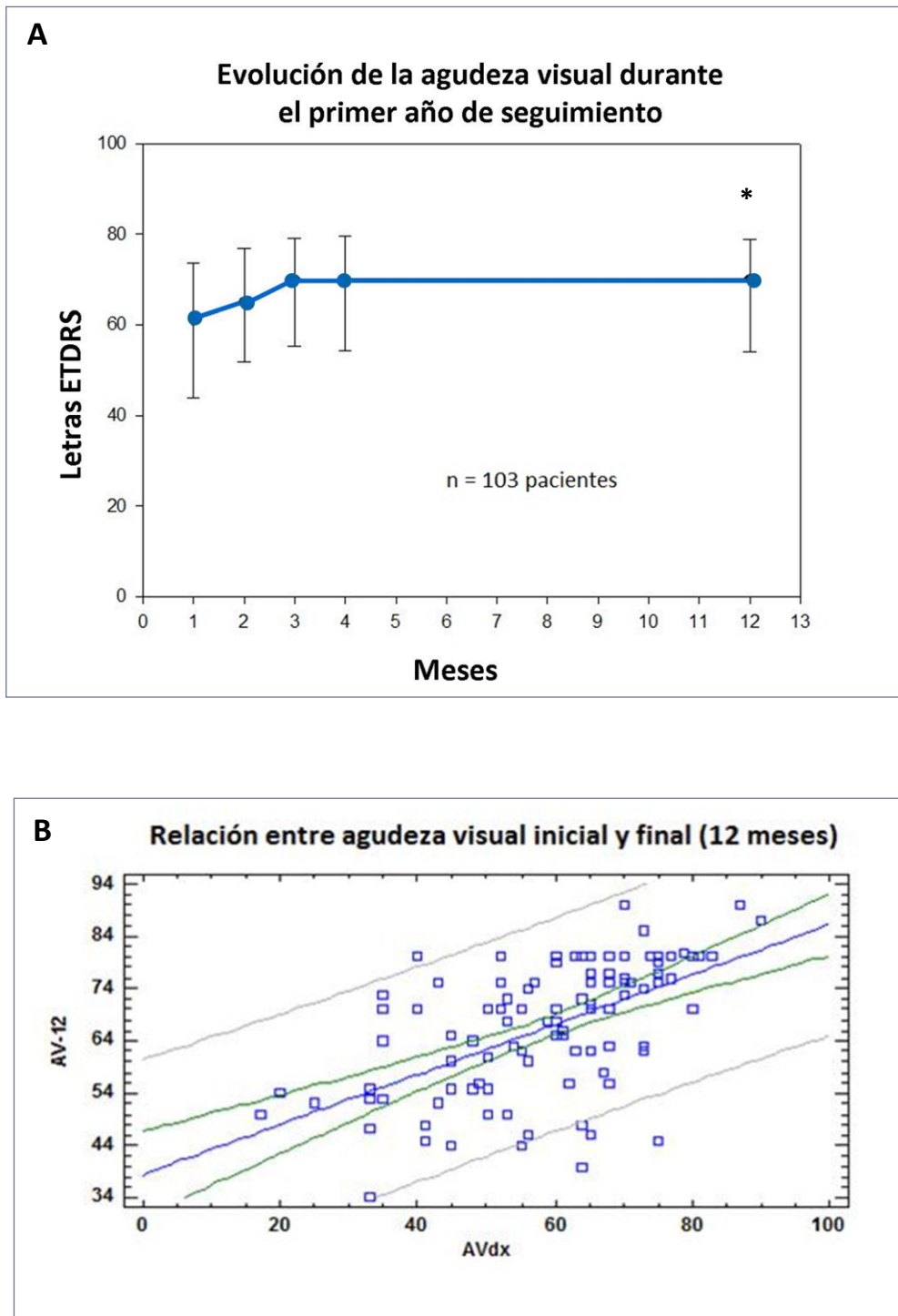


Figura 4.13.- Resultados a un año del tratamiento con ranibizumab (dosis de carga y régimen PRN) en pacientes con DMAE neovascular. (A) Evolución de la agudeza visual en letras ETDRS (medianas). * $p < 0,001$, agudeza visual final vs agudeza inicial. (B) Relación entre la agudeza visual al año y al diagnóstico.

Para el subgrupo de 90 pacientes, se observa a los doce meses un ligero descenso no significativo de la agudeza visual media conseguida tras la dosis de carga y un buen mantenimiento posterior. El subgrupo de 54 pacientes mostró un patrón similar aunque se aprecia una tendencia a la baja a medida que aumenta el tiempo de seguimiento (tres años vs dos años, $p = 0,3$). A los dos años la agudeza visual mejoró en un 71,1% de los pacientes y un 20,4% ganó 15 o más letras. A los tres años, estos valores fueron 62,9% y 25,4%, respectivamente.

En la Tabla 4.12 se recopilan los valores de media de letras ETDRS, desviación estándar, mínimos y máximos en cada momento evaluado (diagnóstico, tras cada dosis de las tres de carga, y cada año hasta un máximo de cuatro años de seguimiento), indicándose el número de pacientes valorados en los distintos períodos de seguimiento.

Tabla 4.12.- Agudezas visuales (AV) medias de los pacientes con DMAE neovascular al diagnóstico y a lo largo del período de seguimiento.

Meses	Meses de seguimiento							
	0	1	2	3	12	24	36	48
Nº Pacientes	103	103	103	103	103	90	54	22
AV Media	58,8	64,2	67,2	66,9	66,5	65,0	62,3	63,1
Desv.Estándar	14,8	12,5	11,8	12,6	12,4	12,8	14,6	14,0
Mínimo	17	25	25	20	34	34	33	32
Máximo	90	86	86	90	90	83	88	86

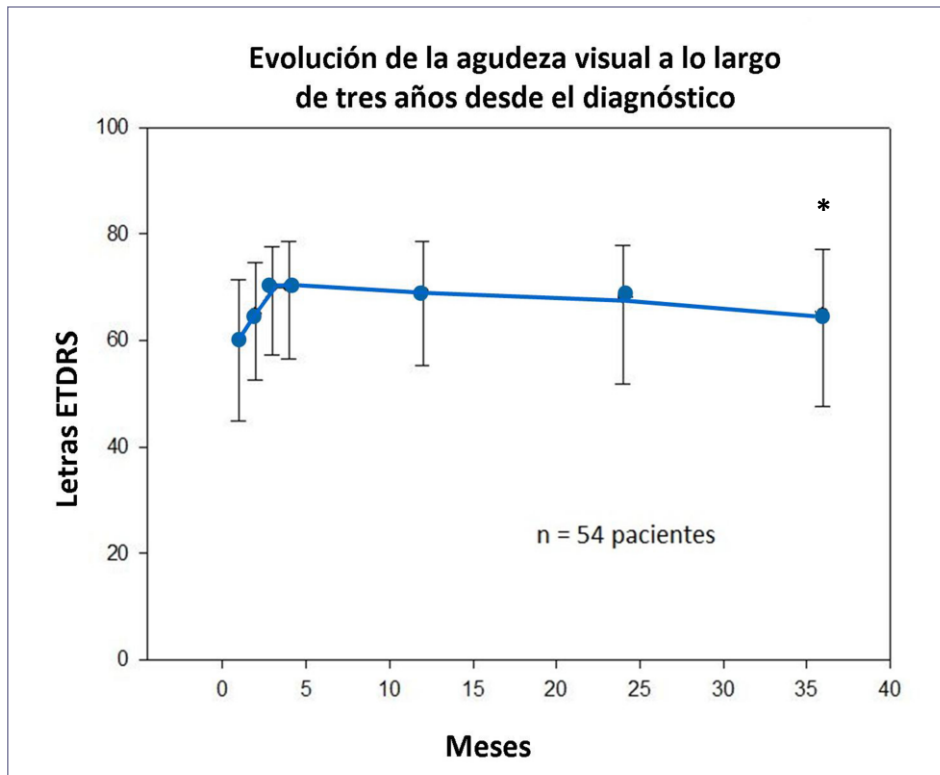
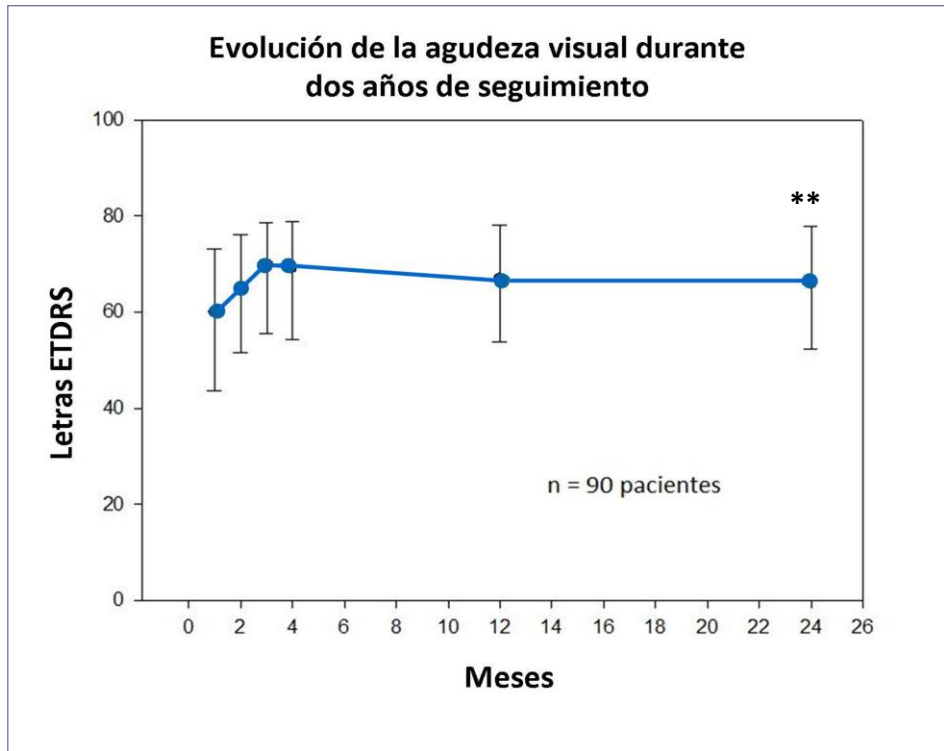


Figura 4.14.- Evolución de la agudeza visual en letras ETDRS (medianas) de pacientes con DMAE neovascular tratados con ranibizumab (dosis de carga y régimen PRN) a lo largo de dos y tres años de seguimiento. Agudeza visual final vs agudeza inicial: ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Como se ha comentado, el protocolo seguido en esta investigación para el tratamiento de la DMAE neovascular mediante ranibizumab comprende la dosis de carga con tres inyecciones mensuales, seguidas de la estrategia PRN. Según este protocolo, el número mínimo de inyecciones que podría recibir un paciente en el primer año del diagnóstico sería 3 y el máximo sería de 12. Dentro de nuestra muestra (n = 103 pacientes), seleccionada para contener representantes de los tres tipos de respuesta, durante el primer año de seguimiento la media total fue de 5,3 (DE 1,8) inyecciones. Un 20,4% recibió únicamente la dosis de carga sin retratamientos en el primer año (Figura 4.15 A). Un 18,4% recibió dosis de carga y un retratamiento adicional (la media de meses de latencia hasta dicho retratamiento fue de 5,5 meses a partir de la tercera dosis de la fase de carga). El resto de los pacientes requirieron un mayor número de inyecciones totales: el 15,5%, un total de 5 inyecciones; el 24,3%, 6; el 10,7%, 7; el 3,9%, 8; el 4,8%, 9. Dos pacientes precisaron 10 y 11 inyecciones por persistencia del fluido intrarretiniano. La causa más frecuente de retratamiento fue la aparición de líquido intra o subretiniano. No se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el número de inyecciones y el tipo de lesión.

Para el grupo de pacientes en los que se completó un seguimiento a dos años (n = 90), la media del número de inyecciones totales durante los 24 meses fue de 8,9 (DE 3,6) y el número máximo fue de 21 (Figura 4.15 B). Según se observa en el gráfico, existen nueve pacientes en los que no se necesitó ningún retratamiento después de la fase de carga (un 10% del grupo).

Para 54 pacientes de la muestra inicial se completó un seguimiento a tres años. La media del número de inyecciones totales recibidas durante este período fue 14,2 (DE 6,7) y el número máximo 24 (Figura 4.15 C). Para este subgrupo, el número de retratamientos durante el segundo año es superior o igual al de los retratamientos del primer año en un 94,4% de los pacientes. Y durante el tercer año de seguimiento este número es superior o igual a los del segundo año en un 76% de los pacientes. En 6 de los 54 pacientes, fue suficiente la fase de carga sin necesidad de inyecciones adicionales (un 11% del grupo). En consecuencia, tanto a dos como a tres años de seguimiento, existe un porcentaje de pacientes, entre un 10 y un 11%, que no requiere retratamientos.

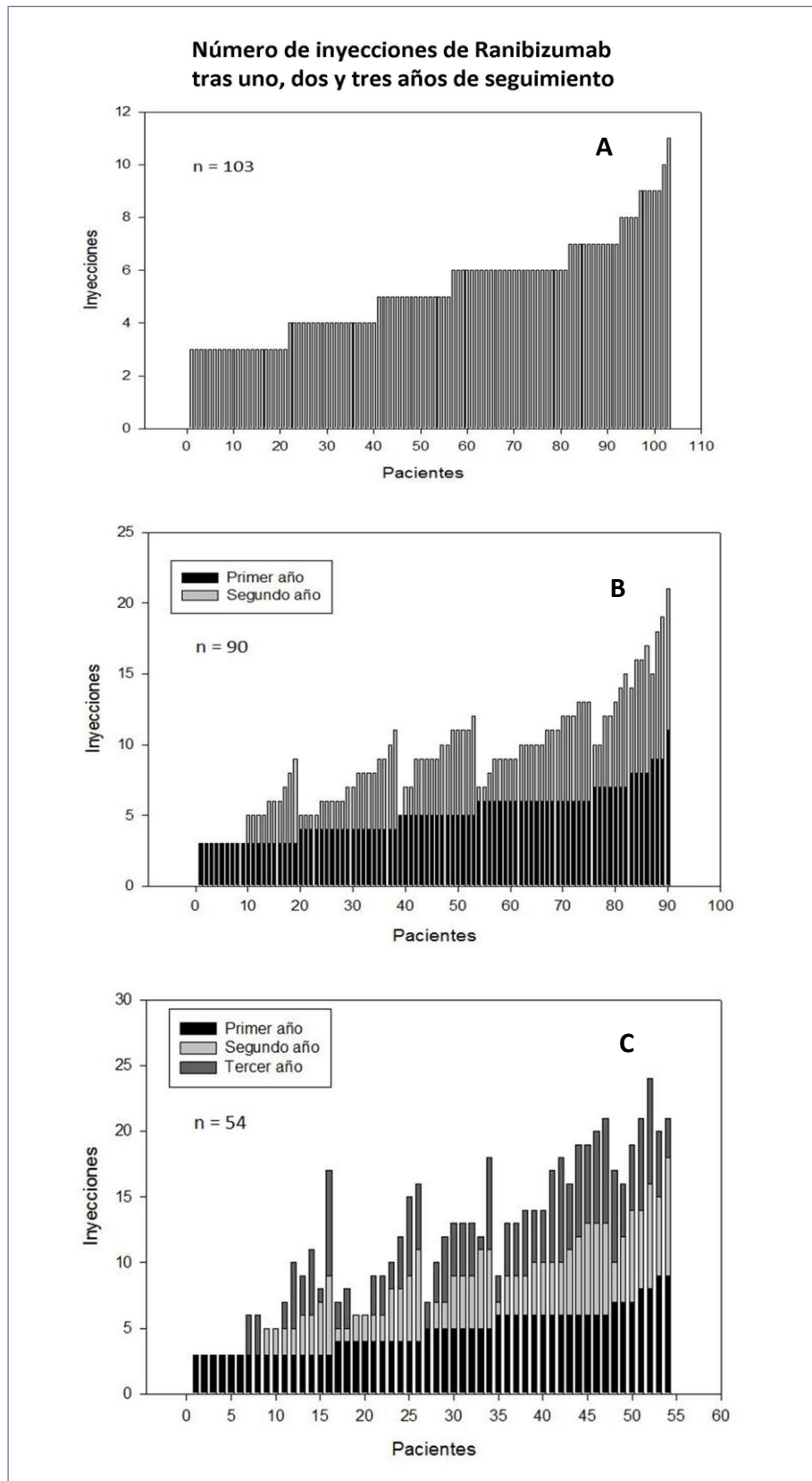


Figura 4.15.- Número total de inyecciones de ranibizumab (dosis de carga + régimen PRN) que recibieron los pacientes de DMAE neovascular tras finalizar el período de seguimiento. A) Un año. B) Dos años. C) Tres años.

La estrategia PRN se diseñó para disminuir el número de inyecciones de ranibizumab con respecto a los regímenes de tratamiento mensuales (estudios MARINA y ANCHOR) sin causar excesivo perjuicio a la mejoría de agudeza visual. Por tanto es interesante saber si el número total de inyecciones de *Lucentis*[®] que recibieron nuestros pacientes durante el período de seguimiento se relaciona con la agudeza visual alcanzada al final del mismo. Con este objetivo, los pacientes de la muestra inicial se han dividido en tres grupos en función del número de inyecciones totales administradas durante un año de seguimiento, recogiendo los valores medios de la agudeza visual a lo largo de este período para cada uno de los grupos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.16.

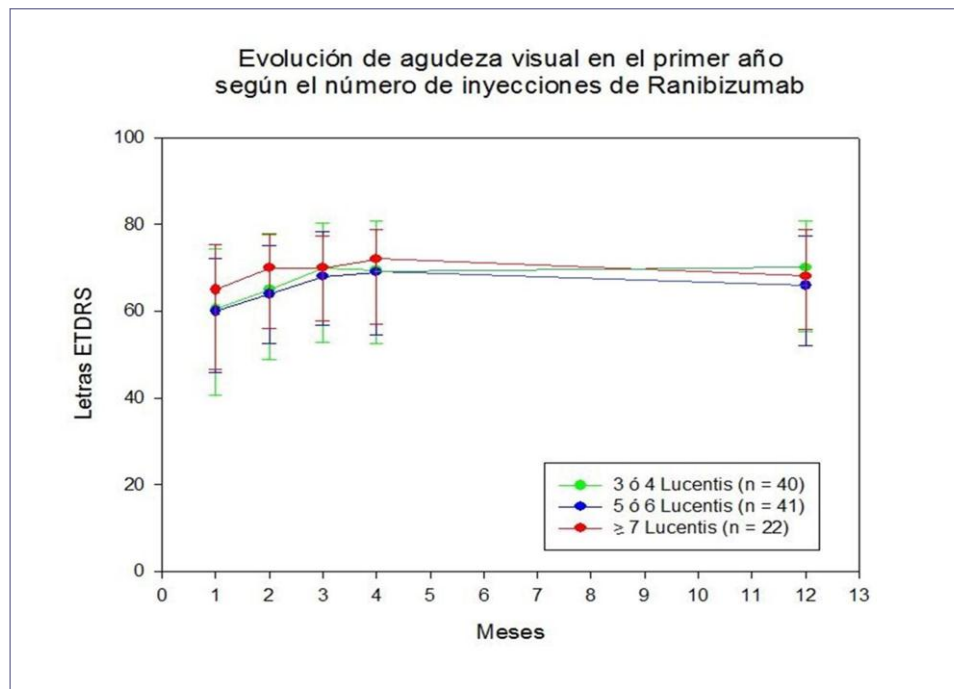


Figura 4.16.- Evolución de la agudeza visual en letras ETDRS (medianas) de los pacientes con DMAE neovascular durante un año de tratamiento con ranibizumab (dosis de carga + régimen PRN) según el número total de inyecciones recibidas.

El grupo que recibió mayor número de tratamientos partía de una mejor visión en el momento del diagnóstico, lo que condiciona la ganancia de agudeza visual durante la fase de carga. Sin embargo, completado el seguimiento a un año, la agudeza visual no era significativamente distinta de la conseguida por los otros dos grupos. De hecho, la tendencia es que el grupo con mejor agudeza visual media al año es el que recibió menor cantidad de retratamientos aunque la relación entre ambos parámetros no es estadísticamente

significativa (análisis de varianza, $p = 0,64$). A partir de estos datos se deduce que el número de inyecciones de *Lucentis*[®], administradas durante un año de acuerdo a los criterios de retratamiento, no influye en la agudeza visual alcanzada por los pacientes al final de este período.

Se ha estudiado la relación entre variables demográficas y resultados funcionales conseguidos con el tratamiento intravítreo, y número de retratamientos. Una edad más avanzada se relaciona con menores agudezas visuales al diagnóstico (correlación de Pearson, $r = 0,34$; $p < 0,001$) y también menores agudezas visuales a los doce meses de seguimiento (correlación de Pearson, $r = 0,27$; $p < 0,01$). Es importante destacar que la edad al diagnóstico no va a condicionar un mayor número de tratamientos (correlación de Pearson, $r = 0,01$; $p = 0,9$), ni tampoco una menor ganancia de visión al año (Rho de Spearman $0,13$; $p = 0,18$).

Como sugería la Figura 4.16, un mayor número de inyecciones no se corresponde con una ganancia superior de agudeza visual en el primer año de tratamiento (Rho de Spearman $0,14$; $p = 0,16$). Finalmente, como ya señalábamos antes, una mejor agudeza visual al diagnóstico limita la ganancia de visión a un año (Rho de Spearman $-0,58$; $p < 0,001$), pero no tiene capacidad de predicción del número de inyecciones que serán necesarias para un paciente concreto (correlación de Pearson, $r = 0,01$; $p = 0,9$).

4.4.4.- ASOCIACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS PARA LOS POLIMORFISMOS Y402H (CFH) Y A69S (LOC387715/ARMS2) Y LA RESPUESTA FUNCIONAL AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB

Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento con ranibizumab, consistente en una dosis de carga con tres inyecciones mensuales seguidas de la estrategia PRN, es eficaz para mejorar la agudeza visual de los pacientes con DMAE neovascular. Los beneficios de esta terapia se mantienen durante períodos prolongados de, al menos, tres años. Sin embargo, hay que considerar que estos resultados suponen la media de todos los pacientes que componen la muestra a estudio. Los comportamientos individuales son altamente variables, tanto en lo que se refiere a la ganancia de agudeza visual, como al número de retratamientos requeridos

a lo largo del período de seguimiento. Entre los factores que podrían influenciar la respuesta a la terapia con ranibizumab se encuentran los factores genéticos.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la posible influencia de los genotipos para los polimorfismos Y402H y A69S de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2*, respectivamente, sobre las manifestaciones fenotípicas de la DMAE neovascular, la respuesta funcional de los pacientes al tratamiento con ranibizumab y el número de retratamientos.

4.4.4.1.- Polimorfismo Y402H, características clínicas y respuesta a uno y dos años de seguimiento

- **Resultados a un año de seguimiento**

La Tabla 4.13 recoge las características demográficas, manifestaciones fenotípicas de los pacientes con DMAE neovascular y respuesta al tratamiento con ranibizumab durante un año en función del genotipo para el SNP Y402H. De los 103 pacientes cuyo genotipo se determinó, 22 fueron homocigotos *wild type* (TT), 26 fueron homocigotos para el alelo de riesgo (CC) y 55 fueron heterocigotos (TC).

No había diferencias significativas entre la edad de diagnóstico en los tres grupos de pacientes en función del genotipo (ANOVA, $p = 0,85$). La afectación bilateral oscilaba entre el 40 y el 80% según el genotipo, con una mayor proporción de casos bilaterales en el grupo TT (Chi cuadrado, $p = 0,03$).

No se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre el genotipo y el tipo angiográfico de neovascularización (test Pearson, Chi cuadrado; $p = 0,32$) aunque se observa que con cada alelo de riesgo la proporción de neovascularización oculta aumenta, mientras que disminuye la de vasculopatía polipoidea (Figura 4.17). La agudeza visual en el momento del diagnóstico tampoco presentaba diferencias significativas en función del genotipo (ANOVA, $p = 0,62$).

Tabla 4.13.- Fenotipos clínicos de los pacientes con DMAE neovascular y respuesta al tratamiento con ranibizumab en función del genotipo para el SNP Y402H.

Característica	Genotipo (n = 103)			Valores de P
	TT	CT	CC	
Nº de pacientes (%)	22 (21,3)	55 (53,4)	26 (25,2)	
Varones - Nº (%) Mujeres - Nº (%)	11 (26,8) 11 (17,7)	21 (51,2) 34 (54,8)	9 (21,9) 17 (27,4)	<i>Chi cuadrado, p = 0,52</i>
Edad de diagnóstico <i>Media (DE)</i>	78,3 (7,5)	77,7 (6,9)	77,1 (7,1)	<i>ANOVA, p = 0,85</i>
Bilateralidad: 60 casos (58,2%) <i>Número de pacientes</i> <i>(% sobre total de casos)</i> <i>(% sobre el genotipo)</i>	17 28,3% 77,3%	33 55% 60%	10 16,7% 38,5%	<i>Chi cuadrado, p = 0,04</i> <i>Chi cuadrado, p = 0,03</i>
Tipo de lesión - Nº (%) <i>Oculto</i> <i>Mínimamente clásica</i> <i>Clásica, Pred. y Parc. Clásica</i> <i>RAP</i> <i>VCP</i>	10 (45,4) 1 (4,6) 4 (18,2) 4 (18,2) 3 (13,6)	30 (54,5) 2 (3,6) 10 (18,2) 12 (21,8) 1 (1,8)	18 (69,2) 1 (3,8) 3 (11,5) 4 (15,3) 0 (0)	<i>Pearson, Chi cuadrado, p = 0,32</i>
Agudeza visual al diagnóstico <i>Media (DE)</i>	57,4 (15,7)	58,2 (15,1)	61,3 (14,1)	<i>ANOVA, p = 0,62</i>
Período de seguimiento (meses)	12	12	12	
Latencia hasta 4ª dosis de Lucentis® <i>Meses: Media (DE)</i>	5,5 (5,1)	8,2 (12,5)	9,9 (16,3)	<i>ANOVA, p = 0,47</i>
Letras ETDRS ganadas al año <i>Media (DE)</i>	10,4 (11,6)	8,4 (12,7)	3,9 (13,6)	<i>Kruskal Wallis, p = 0,19</i>
Ojos con ag. visual mejorada <i>Nº, (%)</i>	19 (86,4)	42 (76,4)	16 (61,5)	<i>Chi cuadrado, p = 0,13</i>
Nº total inyecciones de Lucentis <i>Media (DE)</i>	5,3 (1,8)	5,2 (1,9)	5,4 (1,6)	<i>ANOVA, p = 0,97</i>

El tiempo de latencia (meses transcurridos desde que se terminó la fase de carga hasta el cuarto tratamiento con el anti-VEGF según los criterios de retratamiento) fue de 9,9 meses para el grupo con dos alelos de riesgo y prácticamente se reducía a la mitad cuando ningún

alelo de riesgo estaba presente (reinyección a 5 meses y medio del fin de la fase de carga). Con el grupo heterocigoto fue de 8,2 meses. Estas diferencias no eran estadísticamente significativas (ANOVA $p = 0,47$).

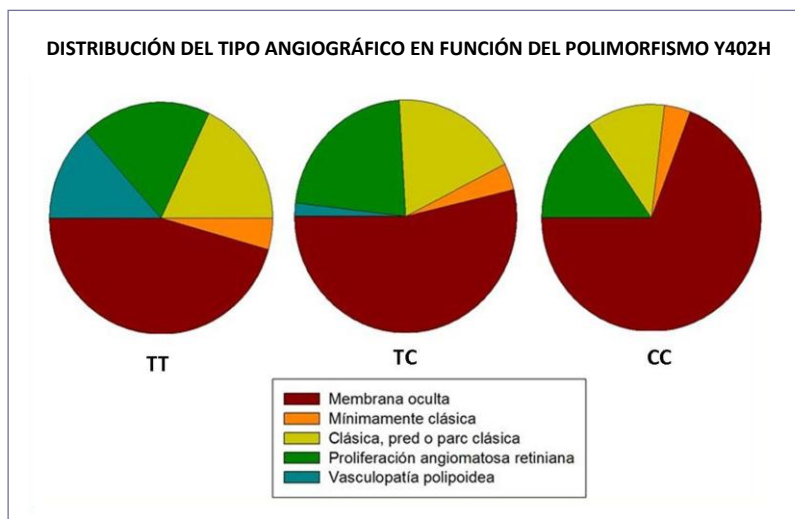


Figura 4.17.- Distribución porcentual del tipo de lesión neovascular en función del genotipo para el polimorfismo Y402H.

En cuanto a los resultados funcionales obtenidos con el régimen PRN, la mejoría de visión conseguida un año después del diagnóstico presenta diferencias en función del genotipo, aunque éstas no alcanzaron significación estadística. El porcentaje de pacientes cuya agudeza visual mejoró en cualquier grado al final del período de seguimiento fue más reducido en el grupo CC que en los grupos TT y CT (Chi cuadrado, $p = 0,13$). Asimismo, la ganancia media en letras ETDRS un año después del diagnóstico fue menor en el grupo con los dos alelos de riesgo (3,9) que en los heterocigotos (8,44) y en los homocigotos *wild type* (10,41) (Kruskal Wallis, $p = 0,19$). (Figura 4.18). Si la comparación se establece entre el grupo homocigoto CC y la combinación de los pacientes que presentan una o dos copias del alelo T, tampoco se obtiene significación estadística ($p = 0,08$).

Sabiendo que las tres primeras inyecciones obedecen en cada paciente a la obligatoriedad de la dosis de carga y no a la respuesta individual a cada inyección, y que no hubo diferencias significativas entre grupos en cuanto a la ganancia de visión durante de la fase de carga (6,6, 7,4 y 11,7 letras en los grupos CC, CT y TT, respectivamente; ANOVA $p =$

0,2), se consideró el cambio de agudeza visual a partir de la última inyección de la fase de carga y se comparó este cambio en cada uno de los genotipos. La media fue -2,7 para el grupo CC, +1,0 para el CT y -1,3 para el TT sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA, $p = 0,24$).

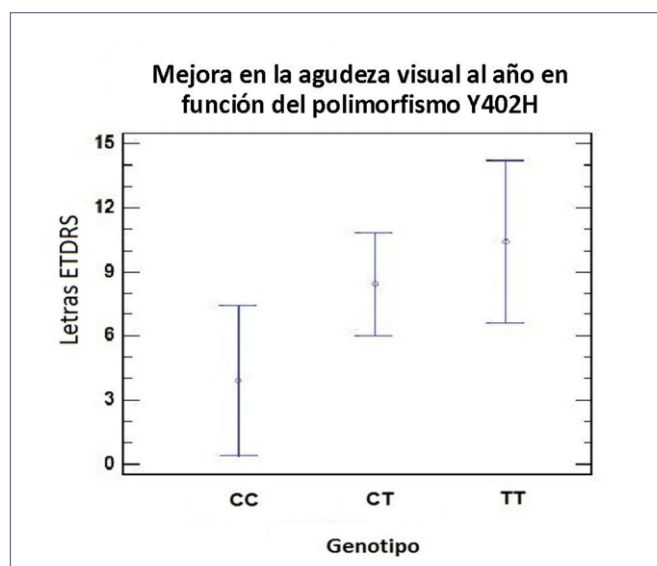


Figura 4.18.- Ganancia media de letras ETDRS por los pacientes con DMAE neovascular al cabo de un año de tratamiento con ranibizumab en función del genotipo para el polimorfismo Y402H.

Finalmente, el número de inyecciones requeridas durante el primer año fue de 5,3 para el grupo TT, de 5,2 para los CT y de 5,4 para los CC, sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA, $p = 0,97$).

En conjunto, estos resultados indican que no hay una asociación estadísticamente significativa entre la respuesta funcional a la terapia con ranibizumab o la necesidad de retratamientos durante un año, y el genotipo para el polimorfismo Y402H. Puesto que la variante de riesgo provoca alteraciones funcionales en el factor H del complemento y probablemente una regulación deficiente de la ruta alternativa de este sistema, cabe pensar que se requiera cierto tiempo para que se manifiesten las consecuencias. Para comprobar esta hipótesis, se ha considerado interesante analizar si existe una asociación entre el genotipo y la respuesta al tratamiento con ranibizumab durante períodos más prolongados.

- *Resultados a dos años de seguimiento*

La Tabla 4.14 recoge los datos correspondientes a los pacientes de la muestra inicial que fueron seguidos durante 2 años (n = 90).

Tabla 4.14.- Respuesta al tratamiento con ranibizumab durante 24 meses en función del genotipo para el SNP Y402H.

Característica	Genotipo (n = 90)			Valores de P
	TT	CT	CC	
Nº de pacientes (%)	20 (22,2)	47 (52,2)	23 (25,5)	
Agudeza visual al diagnóstico <i>Media (DE)</i>	56,1 (15,9)	58,3 (14,9)	60,2 (14,0)	<i>ANOVA, p = 0,70</i>
Agudeza visual a los 24 meses <i>Letras ETDRS: Media (DE)</i>	67 (10,6)	65,5 (12,6)	62 (14,8)	<i>ANOVA, p = 0,38</i>
Letras ETDRS ganadas <i>Media (DE)</i>	11,2 (15,4)	7,1 (14,2)	1,8 (10,6)	<i>Kruskal Wallis, p = 0,11</i>
Ojos con agudeza visual mejorada <i>Nº, (%)</i>	16 (80,0)	33 (70,2)	15 (65,2)	<i>Chi cuadrado, p = 0,55</i>
Nº total de inyecciones de Lucentis® <i>Media (DE)</i>	9,2 (3,2)	9,1 (4,2)	8,6 (3,7)	<i>ANOVA, p = 0,84</i>

Las medias de la visión al diagnóstico de este subgrupo siguen siendo mayores en el grupo CC que en los grupos CT y TT (ANOVA, $p = 0,7$). Sin embargo, la agudeza visual al final de los 24 meses era mayor en el grupo TT que en el CT y el CC aunque las diferencias no son significativas (ANOVA, $p = 0,38$). La Figura 4.19 muestra que la ganancia media en letras ETDRS fue de 1,8 en el grupo homocigoto para el alelo de riesgo, de 7,1 en el grupo heterocigoto y 11,2 en el grupo *wild type* (Kruskal Wallis, $p = 0,11$). Si se compara el grupo CC con los grupos CT y TT combinados, el valor de p es 0,053, próximo a la significación estadística.

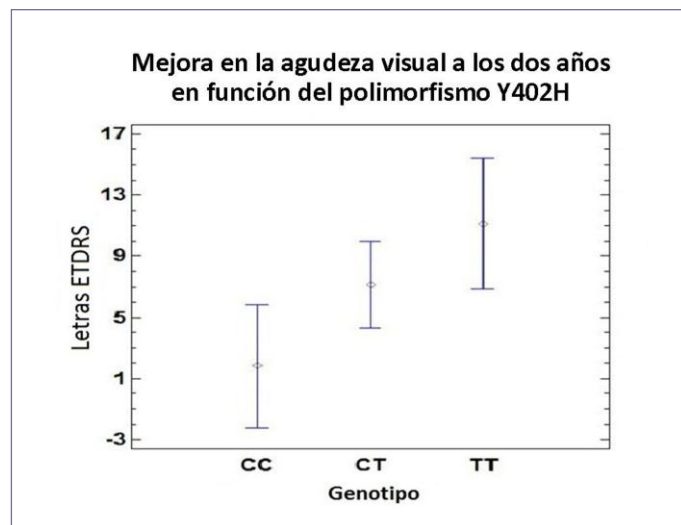


Figura 4.19.- Ganancia media en letras ETDRS por los pacientes con DMAE neovascular a los dos años de tratamiento con ranibizumab en función del genotipo para el polimorfismo Y402H.

No existen diferencias significativas entre la media del número total de inyecciones recibidas por los tres grupos a lo largo del período de estudio (ANOVA, $p = 0,84$). Cuando se considera el período completo de dos años y se descuentan las inyecciones de la dosis de carga, que es obligatoria en todos los pacientes independientemente de la respuesta a cada inyección, tampoco se detectan diferencias (6,2, 6,1 y 5,6 para TT, CT y CC, respectivamente; ANOVA, $p = 0,85$). Igualmente, no son distintas las medias del número de tratamientos a lo largo de los primeros doce meses (5,1, 5,1 y 5,2 en CC, CT y TT, respectivamente; ANOVA, $p = 0,9$), ni las de retratamientos durante el segundo año (4,1, 4,1 y 3,4; ANOVA, $p = 0,51$).

4.4.4.2.- Polimorfismo A69S, características clínicas y respuesta a uno y dos años de seguimiento

- **Resultados a un año de seguimiento**

La Tabla 4.15 recoge las características demográficas, manifestaciones fenotípicas de los pacientes con DMAE neovascular y respuesta al tratamiento con ranibizumab durante un año en función del genotipo para el SNP A69S. De los 103 pacientes secuenciados para el polimorfismo A69S del gen *LOC387715/ARMS2*, 35 fueron homocigotos *wild type* (GG), 20 homocigotos para el alelo de riesgo (TT), 47 heterocigotos (TG) y en un caso, el genotipo no pudo ser determinado.

Tabla 4.15.- Fenotipos clínicos de los pacientes con DMAE neovascular y respuesta al tratamiento con ranibizumab en función del genotipo para el polimorfismo A69S.

Característica	Genotipo (n = 102)			Valores de P
	GG	GT	TT	
Nº de pacientes (%)	35 (34,3)	47 (46,1)	20 (19,6)	
Varones (%)	12 (34,3)	20 (42,6)	9 (45)	
Mujeres (%)	25 (65,7)	27 (57,4)	11 (65)	
Edad de diagnóstico <i>Media (DE)</i>	78,4 (7,0)	78,5 (7,1)	74,7 (7,5)	ANOVA, $p = 0,11$
Bilateralidad: 60 casos (58,8%) <i>Número de pacientes</i> <i>(% sobre total de casos)</i> <i>(% sobre el genotipo)</i>	22 (36,6%) (62,8%)	24 (40,0%) (51,1%)	14 (23,3%) (70%)	<i>Chi cuadrado, $p = 0,66$</i> <i>Chi cuadrado, $p = 0,29$</i>
Tipo de lesión - Nº (%) <i>Oculto</i> <i>Mínimamente clásica</i> <i>Clásica, Pred. y Parc. Clásica</i> <i>RAP</i> <i>VCP</i>	20 (57,1) 0 (0) 5 (14,3) 9 (25,7) 1 (2,9)	26 (55,3) 1 (2,1) 10 (21,3) 8 (17) 2 (4,3)	11 (55) 3 (15) 2 (10) 3 (15) 1 (5)	<i>Pearson Chi cuadrado.</i> $p = 0,23$
Agudeza visual al diagnóstico <i>Media (DE)</i>	62,2 (12,9)	55,5 (16,9)	60,1 (12,1)	ANOVA, $p = 0,11$
Período de seguimiento (meses)	12	12	12	
Latencia hasta 4ª dosis de Lucentis® <i>Meses: Media (DE)</i>	6,2 (8,2)	10,9(16,5)	5,0 (4,0)	ANOVA, $p = 0,11$
Letras ETDRS ganadas al año <i>Media (DE)</i>	6,1 (12,3)	9,4 (13,5)	7,4 (12,2)	<i>Kruskal Wallis, $p = 0,53$</i>
Ojos con agudeza visual mejorada <i>Nº, (%)</i>	24 (68,6)	37 (78,7)	16 (80,0)	<i>Chi cuadrado, $p = 0,5$</i>
Nº total de inyecciones de Lucentis <i>Media (DE)</i>	5,4 (1,8)	5,1 (1,8)	5,3 (1,8)	ANOVA, $p = 0,73$

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre grupos respecto a la edad de diagnóstico y la agudeza visual en este momento (ANOVA, $p = 0,11$). En cuanto a los tipos de lesión, es llamativo que mientras que para el polimorfismo Y402H, con cada alelo

de riesgo aumentaba la proporción de membranas ocultas a expensas de una disminución del número de VCP, ambos tipos están presentes de manera similar en cada uno de los tres genotipos según el polimorfismo A69S (Figura 4.20). Sin embargo, en este caso la lesión mínimamente clásica está ausente en el grupo GG y es más frecuente en el grupo TT. Estas diferencias en la distribución por tipos no alcanzan diferencias estadísticamente significativas (Pearson, Chi cuadrado, $p = 0,23$).

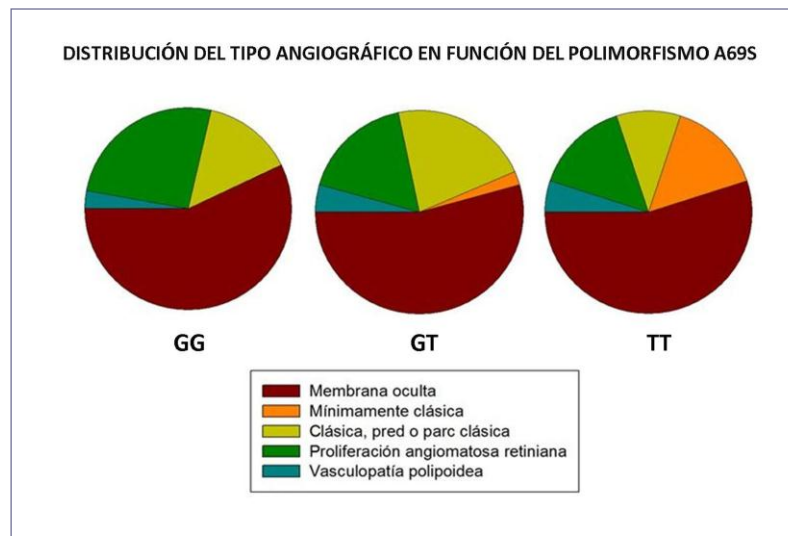


Figura 4.20.- Distribución del tipo de lesión neovascular en función del genotipo para el polimorfismo A69S.

Para todos los grupos era más frecuente la afectación bilateral que la unilateral, sin diferencias significativas entre ellos (Chi cuadrado, $p = 0,29$).

En cuanto a la respuesta al tratamiento con ranibizumab, no se han encontrado diferencias significativas entre grupos respecto a la mejoría de agudeza visual, el período de latencia hasta la cuarta dosis de *Lucentis*[®], o el número total de inyecciones durante el año de seguimiento. Estos resultados indican que, al igual que ocurría con el polimorfismo Y402H, no hay una asociación estadísticamente significativa entre la respuesta funcional a la terapia con ranibizumab o la necesidad de retratamientos durante un año, y el genotipo para el polimorfismo A69S. También en este caso se ha explorado si la influencia del polimorfismo se podría manifestar a tiempos mayores de seguimiento.

- *Resultados a dos años de seguimiento*

Se han registrado los datos correspondientes a 89 de los pacientes de la muestra inicial para los que se determinó el genotipo y que completaron el seguimiento a 24 meses. Estos datos se recogen en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16.- Respuesta al tratamiento con ranibizumab durante 24 meses en función del genotipo para el SNP A69S.

Característica	Genotipo (n = 89)			Valores de P
	GG	GT	TT	
Nº de pacientes (%)	29 (32,6)	42 (47,2)	18 (20,2)	
Agudeza visual al diagnóstico <i>Media (DE)</i>	62 (12,6)	55,2 (16,8)	59 (12,2)	ANOVA, $p = 0,16$
Agudeza visual a los 24 meses <i>Letras ETDRS: Media (DE)</i>	66,4 (13,5)	63,2 (13,3)	66,8(10,6)	ANOVA, $p = 0,46$
Letras ETDRS ganadas <i>Media (DE)</i>	4,4 (11,8)	7,9 (16,2)	7,8 (11,5)	ANOVA, $p = 0,55$
Ojos con agudeza visual mejorada <i>Nº, (%)</i>	19 (65,5)	29 (69,0)	15 (83,3)	Chi cuadrado, $p = 0,4$
Nº total de inyecciones de Lucentis® <i>Media (DE)</i>	8,8 (4)	8,6 (4,1)	9,9 (2,9)	ANOVA, $p = 0,49$

Tampoco a los dos años se encontraron diferencias significativas entre los grupos GG, GT y TT respecto a la agudeza visual al final del período, ni respecto a la media del total de inyecciones del anti-VEGF a lo largo de los 24 meses de seguimiento. El número medio de retratamientos a lo largo de dos años (5,8 para el genotipo GG, 5,6 para el GT y 6,9 para el TT) no presentó diferencias significativas entre grupos (ANOVA, $p = 0,49$). Si se compara el número de retratamientos de los pacientes que tienen al menos una copia del alelo T (5,6, DE 4) con los que no tienen ninguna (6,9, DE 2,9), el valor de p es 0,23 (Figura 4.21).

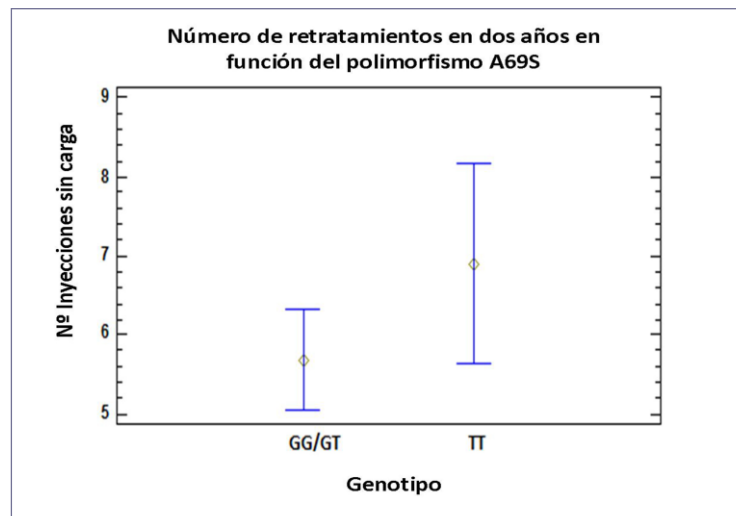


Figura 4.21.- Número medio de retratamientos con ranibizumab que recibieron los pacientes con DMAE neovascular durante los dos años de seguimiento en función del genotipo para el polimorfismo A69S.

4.4.4.3.- Influencia de los polimorfismos analizados sobre la respuesta a tres años de seguimiento

- **Características de la muestra**

De cincuenta y cuatro de los pacientes cuyos genotipos fueron analizados, se dispone de un seguimiento de tres años desde el diagnóstico. De estos, 22 habían sido considerados a priori como respondedores *ideales*, 13 como *dependientes* y 19 como *resistentes*. Este subgrupo de pacientes estaba constituido aproximadamente por la mitad de los que formaban la muestra inicial. Por ello, sus características demográficas y clínicas específicas se detallan en la Tabla 4.17.

Si se comparan las características del subgrupo de 54 pacientes con las de la muestra inicial (n = 103, Tabla 4.11) se observa que no difieren sustancialmente. También es semejante la distribución de los tipos de lesión neovascular. El tipo mayoritario era la oculta (27 pacientes, 50%), seguida por la RAP (15 casos, 27,8%) y el grupo de las clásicas (8 pacientes, 14,8%). La representación de las mínimamente clásicas y de la VCP es minoritaria. La localización de la lesión en el momento del diagnóstico era subfoveal en 30 pacientes (55,5%), juxtafoveal en 18 (33,3%) y el resto, extrafoveales.

Tabla 4.17.- Características al diagnóstico del subgrupo de 54 pacientes con DMAE neovascular que fueron seguidos durante un período de tres años.

Característica	Pacientes con DMAE neovascular con seguimiento a tres años (N = 54)
Edad, Años <i>Intervalo</i> <i>Media ± DE</i>	60 - 90 76,9 ± 7,01
Grupos de edades, N° (%) 60-69 70-79 80-89 ≥ 90	6 (11,1) 32 (59,3) 16 (29,6) 0 (0)
Sexo, N° (%) <i>Varones</i> <i>Mujeres</i>	22 (40,7) 32 (59,2)
Tratamiento previo para DMAE, N° (%) <i>Ninguno</i>	54 (100)
Afectación, N° (%) <i>Bilateral</i> <i>Unilateral</i>	28 (51,9) 26 (48,1)
Ojo a estudio, N° (%) <i>Derecho</i> <i>Izquierdo</i>	24 (44,4) 30 (55,6)
Antecedentes oftalmológicos, N° (%) <i>Fáquicos)</i> <i>Pseudofáquicos*</i>	30 (55,6) 24 (44,4)
Hábito tabáquico, N° (%) <i>Fumadores</i> <i>No fumadores</i> <i>Ex-fumadores</i>	6 (11,1) 32 (59,2) 16 (29,6)
Agudeza visual (letras ETDRS) <i>Mínima</i> <i>Máxima</i> <i>Media ± DE</i>	20 87 58,2 ± 13,3

* La cirugía de cataratas no se había realizado en ningún paciente en los 6 meses previos al diagnóstico.

La agudeza visual al diagnóstico fue de $58,2 \pm 13,3$ letras ETDRS en el ojo a estudio, similar a la media de este parámetro en la muestra inicial ($58,8 \pm 14,8$).

Se investigó la relación entre la respuesta funcional y el tratamiento con ranibizumab, esto es, la agudeza visual mantenida y el número de inyecciones que, con el protocolo PRN, fueron necesarias en los 36 meses que siguieron al diagnóstico de DMAE exudativa. La agudeza visual media al final de este período fue de 62,3 letras ETDRS (DE 14,7). Y sigue presentando correlación con la agudeza visual en el momento de empezar el tratamiento (correlación de Pearson, $r = 0,39$; $p = 0,003$) (Figura 4.22). Se ha calculado un modelo lineal para describir la relación entre la agudeza visual al final de los tres años de seguimiento (AV-36) y la del diagnóstico (Avdx). La ecuación del modelo ajustado es:

$$AV-36 = 37,0253 + 0,434639 * Avdx$$

Por otra parte, a lo largo de los 36 meses de seguimiento, descontando la fase de carga, que es común para todos, habían recibido un promedio de 11,2 (DE 6,7) inyecciones de ranibizumab (14,2 en total) con una desviación estándar de 6,7 (Figura 4.22).

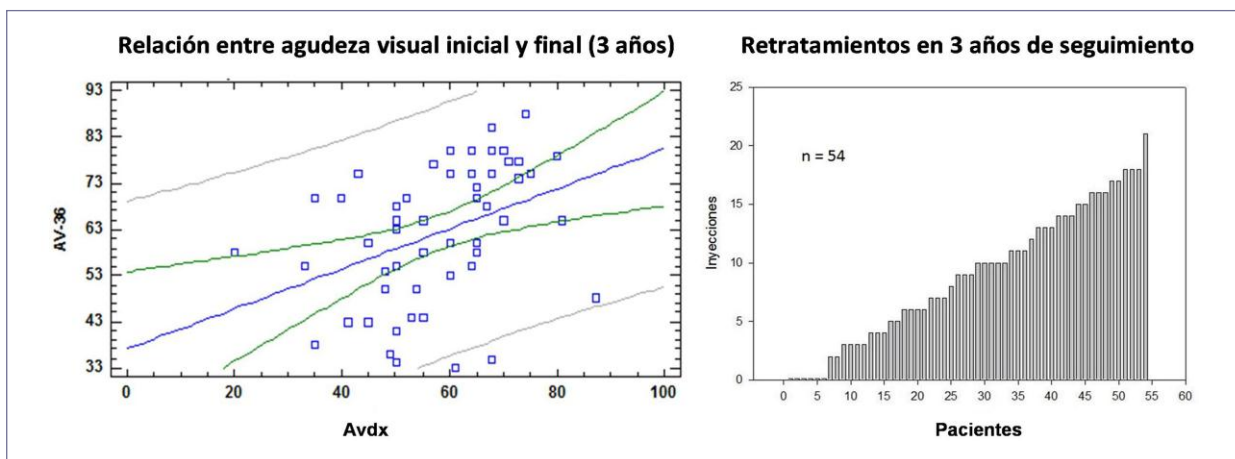


Figura 4.22.- Seguimiento a tres años de 54 pacientes tratados con ranibizumab intravítreo. Izquierda: relación entre agudeza visual al diagnóstico y al final de los 3 años. Los valores medios de agudeza visual inicial y final en letras ETDRS fueron $58,2 \pm 13,3$ y $62,3 \pm 14,7$, respectivamente. Derecha: número de retratamientos recibidos por cada paciente a lo largo de este período. La media fue de $11,2 \pm 6,7$.

- **Respuesta al tratamiento con ranibizumab en función del genotipo**

En la Tabla 4.18 se presentan los datos relativos a la respuesta al tratamiento con ranibizumab durante 36 meses en función de los diferentes genotipos para ambos polimorfismos.

Tabla 4.18.- Respuesta al tratamiento con ranibizumab durante 36 meses en función de los genotipos para los polimorfismos Y402H y A69S.

Característica	Genotipo para Y402H (n = 54)			Genotipo para A69S (n = 53)*		
	TT	TC	CC	GG	GT	TT
Nº de pacientes (%)	9 (16,7)	30 (55,6)	15 (27,8)	12 (22,6)	32 (60,4)	9 (16,9)
AV al diagnóstico <i>Media (DE)</i>	56,8 (14,8)	57,3(13,6)	60,8 (12,1)	61,7 (11,1)	56 (14,1)	60,2 (13)
AV a los 36 meses <i>Letras ETDRS: Media (DE)</i>	57,4 (15,6)	60,8 (13)	68,3 (16,3)	64 (13,4)	61,3 (16,2)	62,1 (11,4)
Letras ETDRS ganadas <i>Media (DE)</i>	0,7 (23,3)	3,5 (15,3)	7,5 (9,1)	2,3 (13)	5,4 (16)	1,9 (18,2)
Ojos con AV mejorada <i>Nº, (% sobre genotipo)</i>	5 (55,6)	17 (56,6)	12 (80,0)	10 (83,3)	21 (65,6)	5 (55,6)
Nº total inyecciones Lucentis® <i>Media (DE)</i>	16,2 (5,3)	14,1 (6,8)	13,2 (67,2)	12,7 (6)	13,3 (6,8)	18,4 (5,1)

(*): El paciente que no pudo ser secuenciado para este polimorfismo estaba en el subgrupo del que se dispone de seguimiento a tres años. AV: agudeza visual.

➤ **POLIMORFISMO Y402H**

- **Respuesta funcional**

La Figura 4.23 muestra la evolución de la agudeza visual a lo largo de los tres años de seguimiento en función del genotipo para Y402H. Al diagnóstico, los valores de este parámetro fueron 56,8 letras ETDRS en el grupo TT, 57,3 en el CT y 60,8 en el CC (ANOVA, $p = 0,67$). Con la fase de carga se induce una mejora en los tres grupos aunque la magnitud del

cambio es mayor en el grupo TT, que en los heterocigotos TC y en los homocigotos CC. Estas diferencias probablemente se relacionan con la distinta agudeza visual al diagnóstico. Al final del primer año, el valor es similar (ANOVA, $p = 0,22$) para los tres grupos: 69,2 (DE 11,9) en los TT, 66,6 (DE 11,1) en los CT y 66,1 (DE 13) en los CC, y al final del segundo año prácticamente coincide: 65,2 (DE 12,4), 65,2 (DE 12) y 64 (DE 15,8), respectivamente (ANOVA, $p = 0,95$). Durante el tercer año se percibe una divergencia entre grupos, de forma que al final del seguimiento, la agudeza visual fue de 57,4, 60,8 y 68,3 para los grupos TT, CT y CC, respectivamente. Aunque se aprecia mayor función cuanto mayor es el número de alelos de riesgo, la diferencia no alcanzó significación estadística (Kruskal-Wallis, $p = 0,09$).

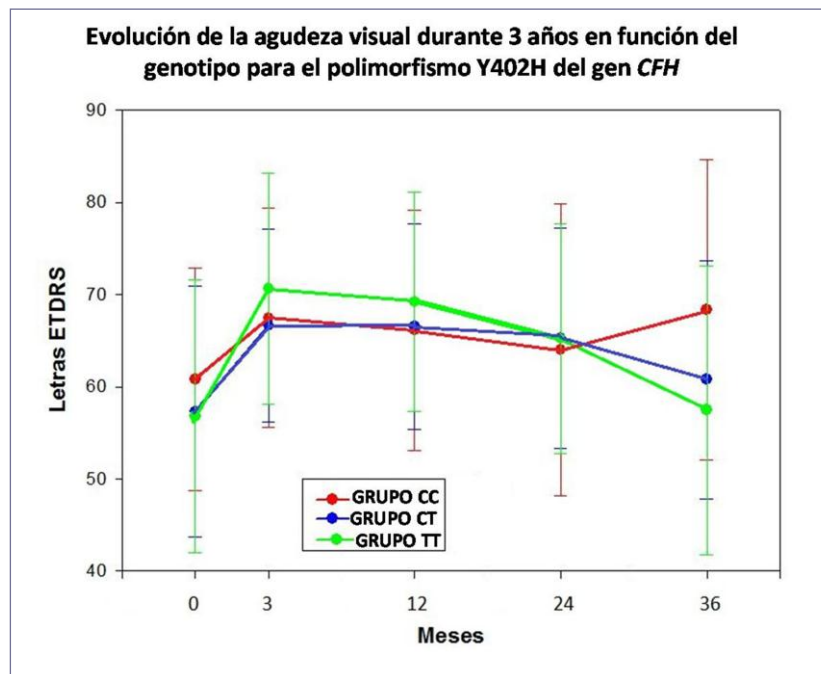


Figura 4.23.- Respuesta funcional al tratamiento con ranibizumab a lo largo de tres años en función del genotipo para el polimorfismo Y402H.

Sin embargo, el análisis ANOVA muestra significación estadística ($p = 0,04$) si se compara la evolución de la visión desde el final de la dosis de carga (obligatoria para todos los pacientes) hasta el final del tercer año en el grupo CC frente al conjunto de los CT y TT, lo que sugiere que la presencia del alelo de riesgo en homocigosis se relaciona con una mejor respuesta funcional a largo plazo. Pero según se expone a continuación, el análisis de

regresión lineal múltiple demuestra que esta relación está afectada por la diferente agudeza visual al diagnóstico.

Con el fin de averiguar si la relación encontrada entre los resultados en términos de agudeza visual y el genotipo para el polimorfismo Y402H del gen *CFH* es espuria por causa de terceras variables se llevó a cabo un análisis de regresión lineal múltiple. Las variables estudiadas se seleccionaron por uno de estos dos motivos:

1. En un análisis sobre los datos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) o que pudieran resultar sospechosas ($p < 0,1$) en la distribución de las variables a estudiar dentro de las categorías genotípicas (test de Kruskal-Wallis en las cuantitativas y test de Chi-cuadrado en las cualitativas).
2. Existían estudios previos en los que se hubiera encontrado relación entre ellas y los resultados funcionales.

Se incluyeron las siguientes variables: edad del paciente en el momento de diagnóstico de la DMAE exudativa (Kruskal-Wallis, $p = 0,055$ al examinar la distribución en los tres grupos CC, CT y TT), localización angiográfica de la lesión (Chi-cuadrado, $p = 0,046$), polimorfismo A69S del gen *LOC387715/ARMS2*, número de retratamientos, antecedentes de facoemulsificación en ese ojo (por sus implicaciones clínicas), y la agudeza visual en el momento del diagnóstico (ya que tanto en el presente estudio como en estudios previos parece hallarse una importante relación entre la agudeza visual al diagnóstico y las agudezas visuales conseguidas con el tratamiento).

En la Tabla 4.19 se muestra el resultado del análisis de regresión lineal múltiple preliminar. Las variables se fueron eliminando del modelo ordenadamente conforme a su significación dentro del mismo. Finalmente, el modelo definitivo para la variable dependiente “cambio en la agudeza visual a 36 meses” queda constituido, incluyendo la agudeza visual basal y excluyendo del mismo al polimorfismo Y402H (Tabla 4.20).

Tabla 4.19.- Análisis de regresión lineal múltiple preliminar sobre los resultados funcionales.

	<i>Cambio en la agudeza visual a 36 meses</i>			
Coefficiente de determinación R ²	0,39			
R ² ajustado	0,24			
Ecuación de regresión	<i>Coefficiente</i>	<i>Error estándar</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Polimorfismo Y402H	(7,64/-0,52)	(3,33/2,81)	2,66	0,082
Polimorfismo A69S	(-2,51/0,31)	(3,61/2,81)	0,25	0,778
AFG localización	(-5,22/-0,85)	(3,59/3,45)	1,06	0,354
Facoemulsificación	4,56	2,19	4,31	0,044
Retratamientos	0,13	0,32	0,16	0,687
Edad al diagnóstico	0,19	0,32	0,34	0,564
Agudeza visual basal	-0,7	0,17	16,46	0,0002

Tabla 4.20.- Factor del Modelo definitivo del análisis de regresión lineal múltiple sobre los resultados funcionales.

	<i>Cambio en la agudeza visual a 36 meses</i>			
Valor <i>p</i> del modelo	0,0002			
Coefficiente de determinación R ²	0,23			
R ² ajustado	0,22			
Ecuación de regresión	<i>Coefficiente</i>	<i>Error estándar</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Agudeza visual basal	-0,56	0,14	16,1	0,0002

Por tanto, el análisis de regresión lineal múltiple **desmiente que exista una verdadera relación entre el polimorfismo Y402H y los resultados funcionales a los tres años de seguimiento**. La única relación verdadera entre los factores estudiados es la que existe entre el cambio conseguido en tres años de seguimiento y la agudeza visual en el momento del diagnóstico.

- **Número de retratamientos**

La media de retratamientos durante los tres años de seguimiento fue de 13,2 para el grupo TT, 11,1 para el TC y 10,2 para el CC, sin diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p = 0,56$).

➤ POLIMORFISMO A69S

- **Respuesta funcional**

La agudeza visual después de tres años de seguimiento fue similar en los tres grupos: GG (64 letras), grupo TT (62,1) y grupo heterocigoto (61,3) (ANOVA, $p = 0,87$). Durante el primer año alcanzan agudezas visuales de 68,7, 66,3 y 66,6 letras ETDRS (DE 9,4, 11,1 y 17) (ANOVA, $p = 0,8$). Al final del segundo año la visión era de 67, 63,9 y 65,2 letras (DE 13, 14 y 10,8) (ANOVA, $p = 0,8$). La evolución a lo largo del último año, consistió en una pérdida media de letras (3, 2,5 y 3,1 en los grupos GG, GT y TT respectivamente) sin diferencias entre grupos (ANOVA, $p = 0,97$).

No se encontró, por tanto, ninguna relación entre el polimorfismo A69S y la evolución funcional.

- **Número de retratamientos**

El número de retratamientos a lo largo de los tres años es mayor en el grupo de los homocigotos para el alelo de riesgo que en el de los heterocigotos o en el de los pacientes que no poseen ningún alelo T (ANOVA, $p = 0,08$). Así, para el grupo TT la media de retratamientos fue de 15,4, para el grupo GT, de 10,3 y en el grupo GG 9,7. Si se agrupan los pacientes que tienen al menos un alelo G, y se compara el número de retratamientos recibido por este grupo a lo largo de los tres años con el de los pacientes que no poseen ninguna copia de este alelo, la diferencia resulta estadísticamente significativa (ANOVA, $p = 0,02$) (Figura 4.24).

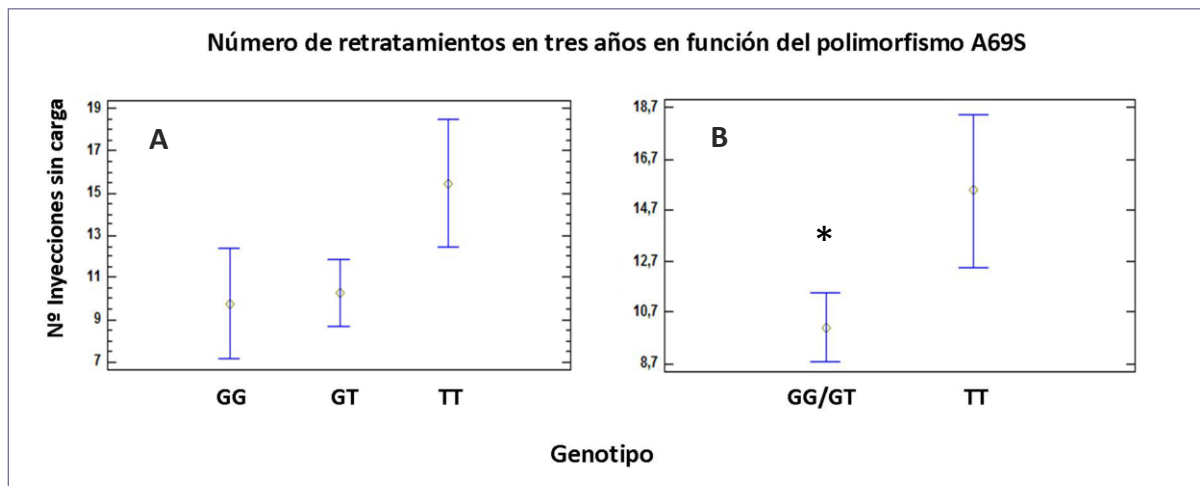


Figura 4.24.- Número medio de retratamientos con ranibizumab recibido por los pacientes con DMAE neovascular durante los tres años de seguimiento en función del genotipo para el polimorfismo A69S del gen *LOC387715/ARMS2*. (B) * Diferencia significativas TT vs GG/GT, $p = 0,02$.

La Tabla 4.21 recoge los resultados obtenidos si la comparación entre el número de retratamientos en los grupos TT y GG/GT se establece en diferentes intervalos del período de seguimiento total. Se observa que las diferencias son estadísticamente significativas sólo para el período completo de tres años o para el intervalo 36-12 meses (que excluye la dosis de carga obligatoria). Esto indica que la presencia del alelo de riesgo en homocigosis se asocia con la necesidad de un mayor número de retratamientos pero el efecto sólo se hace evidente si el tiempo de seguimiento es suficientemente prolongado.

Tabla 4.21.- Inyecciones de ranibizumab recibidas por los pacientes en diferentes períodos del seguimiento a tres años según el genotipo para el polimorfismo A69S.

Nº medio de inyecciones de Lucentis® en los períodos:	Grupo TT	Grupo GT/GG	Valor de P
<i>Meses 36-0</i>	15,4	10,1	0,02*
<i>Meses 36-12</i>	13,7	8,3	0,009**
<i>Meses 24-12</i>	4,3	3,1	0,15
<i>Meses 36-24</i>	4,7	3,4	0,12
<i>Meses 12-0</i>	1,77	1,77	0,99

Se excluyen las tres inyecciones de la dosis de carga, que es obligatoria para todos los pacientes con independencia de la respuesta individual.

Se ha llevado a cabo un análisis de regresión lineal múltiple para verificar que la relación aparente entre la necesidad de retratamientos con ranibizumab y el genotipo para el polimorfismo A69S no es producto de terceras variables. De forma análoga a como se realizó con el polimorfismo Y402H y la respuesta funcional, se incluyeron las siguientes variables: la edad del paciente en el momento de diagnóstico de la DMAE exudativa, la agudeza visual basal, la localización angiográfica de la lesión (Kruskal-Wallis, $p = 0,055$ al examinar la distribución en los tres grupos GT, TT y GG), el polimorfismo Y402H y el A69S. Se muestra el análisis preliminar en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22.- Análisis de regresión lineal múltiple preliminar sobre la necesidad de retratamientos.

	<i>Retratamientos en tres años</i>			
Coeficiente de determinación R^2	0,20			
R^2 ajustado	0,07			
Ecuación de regresión	<i>Coeficiente</i>	<i>Error estándar</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Polimorfismo A69S	-2,252	1,18	3,61	0,063
Polimorfismo Y402H	(-2,279/-0,785)	(1,49/1,29)	1,61	0,212
AFG localización	(2,693/0,914)	(1,59/1,49)	1,77	0,182
Edad al diagnóstico	-0,057	0,14	0,16	0,691
Agudeza visual basal	0,027	0,07	0,14	0,709

Las variables se fueron eliminando del modelo ordenadamente conforme a su significación dentro del mismo. Finalmente, el modelo definitivo para la variable dependiente “retratamientos en tres años” queda constituido incluyendo únicamente el polimorfismo A69S (Tabla 4.23). Para facilitar la comprensión del modelo, se han aceptado dos categorías: por un lado los pacientes TT y por otro los GG/GT.

Tabla 4.23.- Factor del Modelo definitivo del análisis de regresión lineal múltiple sobre la necesidad de retratamientos con ranibizumab.

	<i>Retratamientos en tres años</i>			
Valor <i>p</i> del modelo	0,024			
Coefficiente de determinación R ²	0,09			
R ² ajustado	0,07			
Ecuación de regresión	<i>Coefficiente</i>	<i>Error estándar</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Polimorfismo A69S	-2,66	1,15	5,35	0,024

La ecuación genérica del modelo ajustado sería:

$$\text{Retratamientos a tres años} = 12,8 - 2,6 \times \text{Genotipo para A69}$$

donde “genotipo” vale 1 si el polimorfismo es GT ó GG y, por el contrario, vale -1 si el polimorfismo es TT. Lo que equivale a decir que, **durante el seguimiento a tres años, los pacientes con la variante TT recibirán más retratamientos que los otros genotipos (GT y GG). Esta relación no parece deberse a interacción con los otros factores estudiados.**

4.5.- EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB SOBRE LA MORFOLOGÍA MACULAR

La tomografía de coherencia óptica se ha convertido en un instrumento fundamental en el manejo de la degeneración macular, tanto en el seguimiento de los pacientes como en la decisión de retratamiento. La adquisición de tomografías en el momento del diagnóstico y en cada revisión posterior permite valorar el estado inicial y la evolución de ciertos parámetros que se relacionan con la ultraestructura macular. Esta información, además de condicionar la aplicación de posibles retratamientos, puede ser de utilidad para tratar de identificar factores pronóstico de la respuesta a la terapia con ranibizumab y factores predictivos del resultado visual. Con la OCT de dominio espectral (SD-OCT) se consiguen imágenes de alta resolución que permiten una visualización más detallada de las estructuras retinianas que las tomografías realizadas con la OCT de dominio temporal (TD-OCT).

De los 103 pacientes incluidos en el estudio **E3** para los cuales se determinó el genotipo, 47 (45,6% del total) fueron diagnosticados con posterioridad a enero de 2009 (fecha desde la que se dispone en nuestro Servicio del Spectralis-HRA). Todos ellos poseen registro tomográfico con SD-OCT antes del tratamiento, después de cada inyección de la dosis de carga y en cada revisión posterior. El resto de la muestra se había incorporado a seguimiento en el Servicio entre 2006 y 2008, por lo que las tomografías se realizaron mediante TD-OCT (Stratus). Por no ser comparables los datos de ambos aparatos, en este estudio se ha preferido trabajar con las imágenes de SD-OCT (Spectralis) por sus ventajas respecto a las de TD-OCT (Stratus) (resolución, software de seguimiento, sistema *Tru Track*).

A continuación se detallan las características demográficas de estos 47 pacientes. La media de edad fue 81,9 años (DE 7,3) con un intervalo de edades comprendido entre 65 y 94 años. Por grupos de edad, había seis pacientes (12,8%) comprendidos en el intervalo de 60 a 69 años, veinte (42,6%) entre los 70 y 79, quince (31,9%) entre los 80 y 89 y seis (12,8%) con más de 89 años. Un 38,3% de la muestra eran varones. Ninguno había recibido tratamiento para la neovascularización en ningún otro Centro. En un 59,6% de los casos, el ojo a estudio fue el derecho. En el momento del estudio, la afectación fue unilateral en un 40,4% de los pacientes. Un 53,2% eran pseudofáquicos, mientras que el resto eran fáquicos. Con respecto al hábito tabáquico, el 12,8% eran fumadores activos, 40,4% exfumadores, y un 46,8% nunca

había fumado. Al momento del diagnóstico, la mínima agudeza visual fue de 17 letras ETDRS y la máxima de 90 letras. La agudeza visual media para la muestra fue 58,3 (DE 17,8).

Según el comportamiento angiográfico, la muestra estaba compuesta por 28 membranas ocultas (59,6%), tres mínimamente clásicas (6,4%), nueve del grupo formado por las clásicas, predominantemente clásicas y parcialmente clásicas (19,1%), cinco RAP (10,6%) y dos VCP (4,3%). La localización era subfoveal en el 80,9% de los casos y yuxtafoveal en el 19,1%. Tras doce meses de seguimiento, la agudeza visual media era de 66,6 (DE 13,8).

4.5.1.- PARÁMETROS MORFOLÓGICOS EVALUADOS MEDIANTE SD-OCT

Se midieron el grosor retiniano central, la extensión y el grosor de las alteraciones secundarias al proceso vascular en sí mismo, y el estado de las líneas que representan la membrana limitante externa y la unión de los segmentos externos e internos de los fotorreceptores. Estos parámetros se han evaluado en el momento del diagnóstico y en cada una de las visitas posteriores. La presencia de líquido intrarretiniano y de desprendimiento del epitelio pigmentario se ha registrado únicamente en el momento del diagnóstico.

4.5.1.1.- Grosor retiniano central

La Figura 4.25 muestra la evolución del grosor retiniano central (CRT) con la terapia antiangiogénica. En el momento del diagnóstico, el CRT medio fue de 412,3 micras (DE, 213,5), con un valor máximo de 1098 y un mínimo de 149 micras. La dosis de carga supone una disminución significativa ($p < 0,001$) y relevante de este parámetro hasta un valor promedio de 287,2 micras. La disminución media fue de 125,1 micras (DE 37,8; IC 95%: 50,85-199,31) y el máximo descenso alcanzó las 633 micras. Hay que señalar que 5 pacientes (10,6%) presentaron engrosamiento retiniano central a pesar de la dosis de carga (máximo de 52 micras) y otros 7 no consiguieron la resolución del edema macular. A los doce meses de seguimiento, el CRT medio fue 322,7 micras (DE 181,7), ligeramente superior al conseguido tras la fase de carga (diferencia no significativa) pero significativamente menor que el CRT basal.

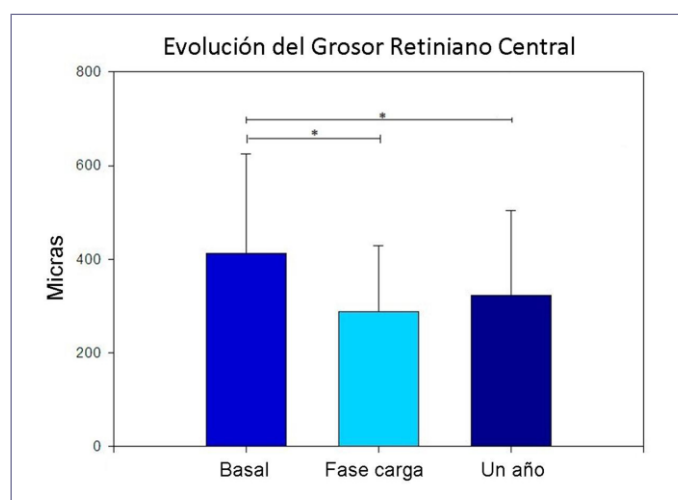


Figura 4.25.- Respuesta del grosor retiniano central al tratamiento con ranibizumab tras la dosis de carga y al año de seguimiento. * $p < 0,001$.

Existe una correlación positiva entre el CRT en el momento de iniciar el tratamiento y el cambio en el CRT al final de la fase de carga (correlación de Pearson, $r = 0,75$; $p < 0,001$). También entre el CRT de inicio y el CRT al final del primer año (correlación de Pearson, $r = 0,84$; $p < 0,001$).

La Figura 4.26 muestra la relación entre CRT y función visual. En el momento del diagnóstico, la agudeza visual se correlaciona negativamente con el CRT inicial (correlación de Pearson, $r = -0,45$; $p = 0,001$) (Figura 4.26 A). Curiosamente, a los doce meses la agudeza visual no llega a correlacionarse con el CRT (correlación de Pearson, $r = -0,27$; $p = 0,07$), (Figura 4.26 B), y la ganancia en letras ETDRS con respecto al descenso del CRT no se ajusta a un modelo lineal (Figura 4.26 C). Sí se encontró una relación estadísticamente significativa entre la agudeza visual al final del primer año y el espesor foveal en el momento del diagnóstico (correlación de Pearson, $r = -0,51$; $p < 0,001$). Asimismo, la reducción del CRT durante la fase de carga se relaciona con la reducción global de este parámetro el primer año (correlación de Pearson, $r = 0,62$; $p < 0,001$).

En resumen, a mayor CRT inicial, mayor es el cambio inducido por la fase de carga de ranibizumab y mayor será también el cambio en el CRT al año. Y, en cuanto a función visual, a mayor CRT inicial corresponden menores agudezas visuales iniciales y también menor visión al año. Sin embargo, no existe una relación clara entre los valores de espesor retiniano central y agudeza visual al año.

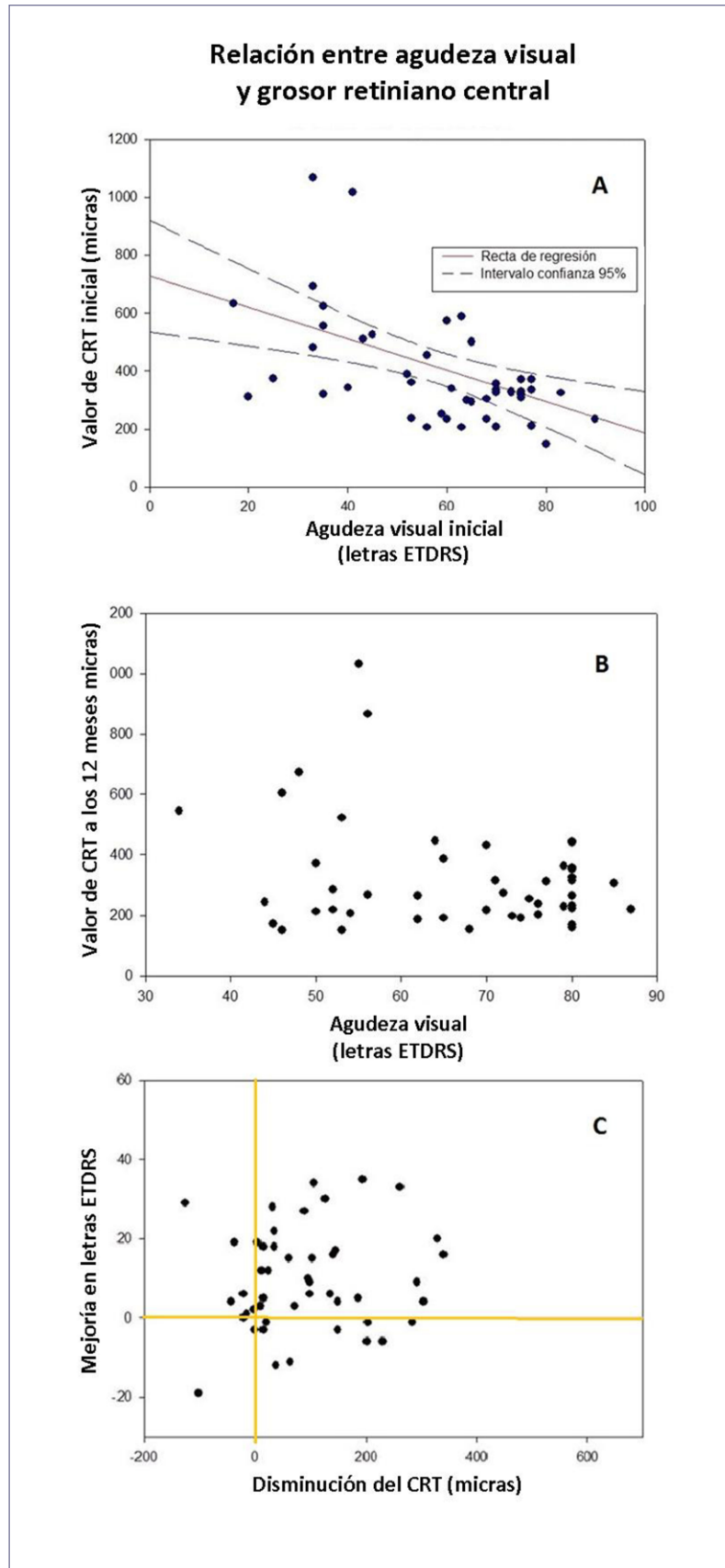


Figura 4.26.- Correlación entre el grosor retiniano central (CRT) y la visión en el momento del diagnóstico (A) y al final del primer año (B). (C): Cambios en la agudeza visual frente a los cambios en el espesor central.

4.5.1.2.- Alteraciones propias del complejo neovascular

Además del CRT, se cuantificó la extensión de las alteraciones retinianas secundarias al proceso neovascular, medidas a nivel de la línea del EPR sano mediante el calibrador manual. Los resultados se presentan en la Figura 4.27 A.

La media de este registro en el momento del diagnóstico fue de 3087,8 micras (DE 1083,9). El valor máximo fue de 5173 micras y el mínimo de 413 micras. Existe una correlación positiva entre las dimensiones horizontales y verticales de las lesiones al inicio del tratamiento (Rho de Spearman 0,45; $p = 0,001$). Tras la dosis de carga con ranibizumab, la extensión de la lesión en el global de la muestra se redujo significativamente con respecto al valor basal ($p = 0,04$). Sin embargo, individualmente, la respuesta de este parámetro es mucho más variable que la del CRT. De hecho, en más de un tercio de los pacientes (17 sujetos) la extensión de las alteraciones secundarias a la neovascularización se incrementa a pesar de la dosis de carga. No quiere decir esto que el tamaño del componente neovascular sea mayor, sino que bastaría, por ejemplo, con que aumentara la extensión del desprendimiento de retina neurosensorial. Pasados doce meses, la extensión media se redujo un promedio de 341 micras (DE 1100,2) con respecto al valor inicial, aunque la diferencia no es significativa ($p = 0,16$). El máximo cambio fue de 4254 micras y el mínimo correspondió a un aumento en la extensión de 1569 micras. Este aumento se observó en un 40,4% de los pacientes.

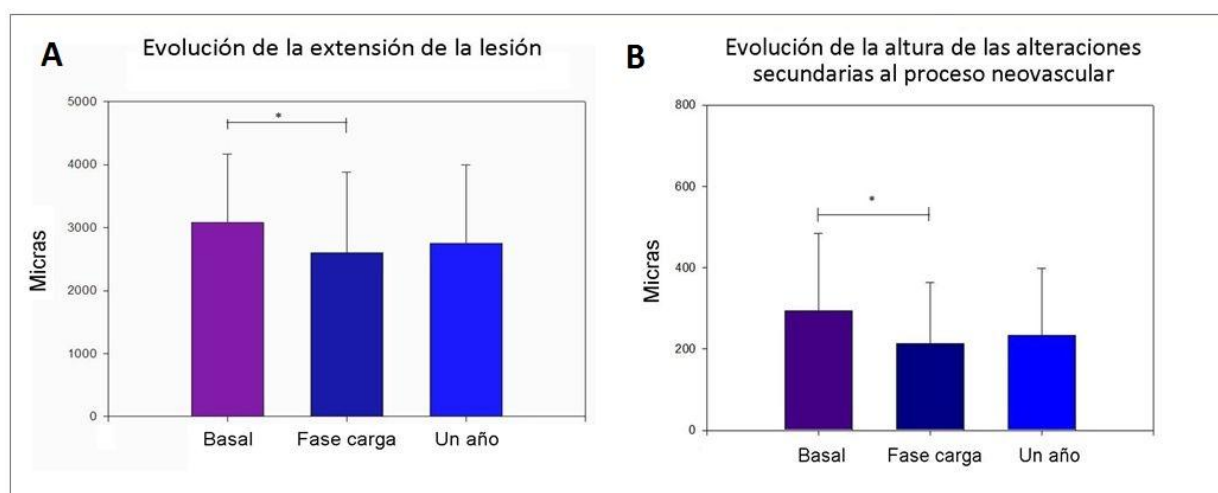


Figura 4.27.- Evolución de las alteraciones propias del complejo neovascular con la terapia con ranibizumab. (A) Respuesta de la extensión de la lesión tras la dosis de carga y al año de seguimiento. (B) Cambios en la altura de las alteraciones secundarias al proceso neovascular. * $p < 0,05$.

No se ha encontrado correlación entre la extensión de la lesión y la agudeza visual, ni en el momento basal (correlación de Pearson, $r = -0,12$; $p = 0,43$), ni tras la fase de carga (correlación de Pearson, $r = -0,10$; $p = 0,51$), ni al final del primer año (correlación de Pearson, $r = -0,15$; $p = 0,31$). Asimismo, la extensión de la lesión al diagnóstico no se correlaciona con la agudeza visual final (correlación de Pearson, $r = -0,16$; $P = 0,28$).

También se valoró la altura de las alteraciones retinianas secundarias al proceso neovascular, medida desde la línea basal del EPR sano hasta retina neurosensorial (Figura 4.27 B). Al inicio, la media fue de 294 micras (DE 191,2), con un mínimo de 67 y un máximo de 942. Tras la fase de carga, se produce una disminución estadísticamente significativa ($p = 0,02$) hasta una media de 212,5 micras. Doce meses después del diagnóstico, la altura media es de 232,8 micras, sin diferencias significativas con respecto al valor inicial. Tampoco se encontró relación entre este parámetro y la agudeza visual en el momento del diagnóstico (correlación de Pearson, $r = -0,23$; $p = 0,11$), tras la fase de carga (correlación de Pearson, $r = -0,14$; $p = 0,31$), o al final del primer año (correlación de Pearson, $r = -0,07$; $p = 0,6$).

4.5.1.3.- Línea de unión de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (IS/OS)

Se asignó un valor numérico al estado de la línea de unión de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (véase sección 3.2.4 de Materiales y Métodos). Este valor oscila entre 0 y 4, siendo cero la integridad total de la línea y cuatro la desestructuración total. Análogamente, este mismo criterio fue utilizado para asignar un valor numérico al estado de la membrana limitante externa.

La Figura 4.28 muestra la relación entre la agudeza visual y el estado de conservación de la línea IS/OS al diagnóstico, tras la dosis de carga con ranibizumab y a los doce meses de seguimiento. En el momento del diagnóstico, el valor medio del estado de la línea IS/OS fue de 3,04 (DE 1,5). En el 12,7% de los casos se apreciaba indemnidad de la línea IS/OS, un 10,6% presentaban desestructuración leve, 12,7% desestructuración severa y el 63,8% una desestructuración total. Los pacientes con algún grado de conservación de la línea IS/OS tenían una agudeza visual promedio 18 letras superior a la de los pacientes con desestructuración total de la misma (medias 70 y 51,6 letras ETDRS, respectivamente; Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

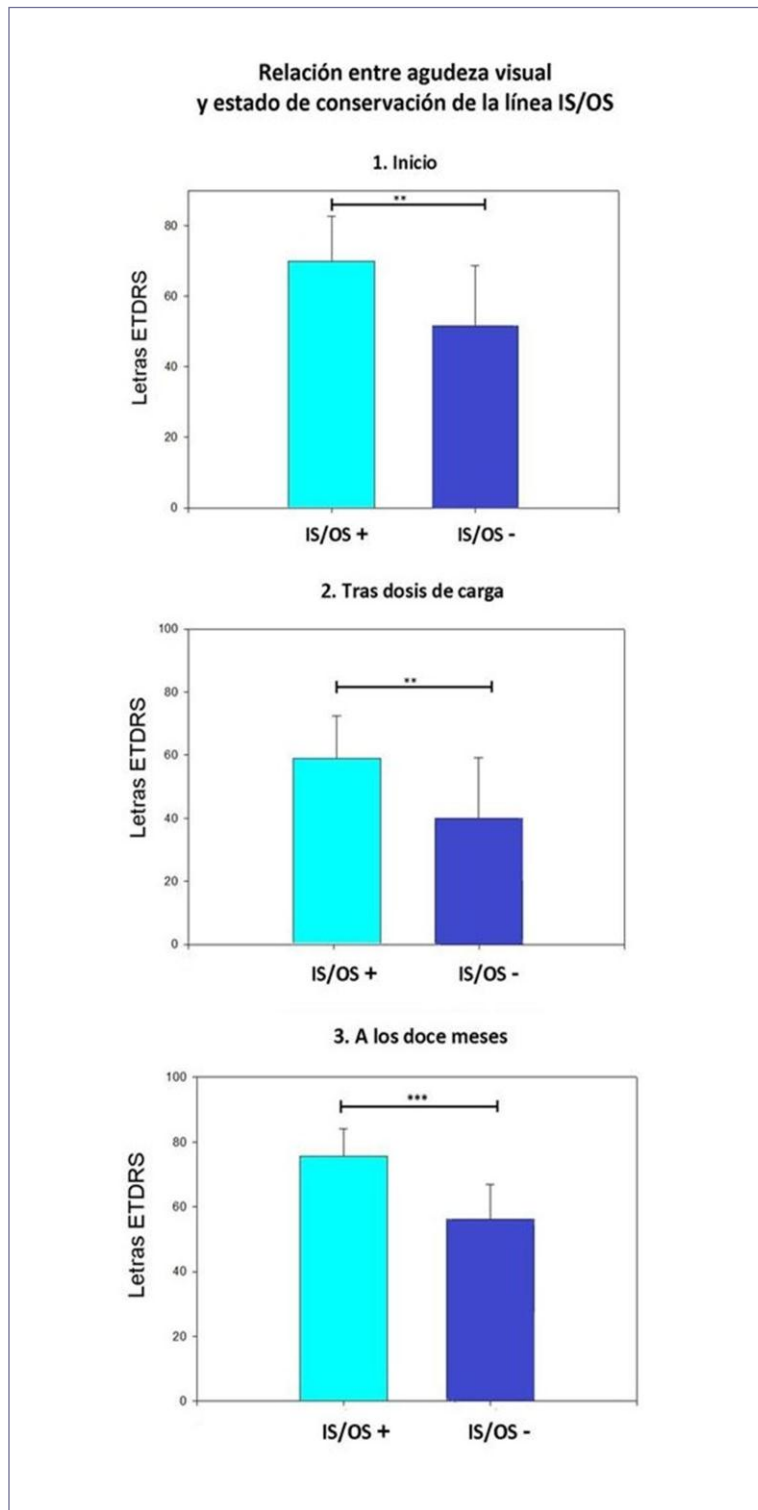


Figura 4.28.- Agudeza visual en función del estado de preservación de la línea IS/OS. IS/OS+ : pacientes que presentan algún grado de conservación de la línea IS/OS en las imágenes de SD-OCT; IS/OS- : pacientes con desestructuración total de dicha línea en las tomografías. Significación estadística: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Al final de la fase de carga, la media del estado de la línea IS/OS fue de 2,63 (DE 1,55). Un 14,8% presentaba línea IS/OS íntegra; 14,8% alteraciones leves; 8,5% alteraciones moderadas; 14,8% alteraciones severas y 46,8% desestructuración total. También al final de esta fase existen diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con preservación y aquellos con desestructuración respecto a su agudeza visual (visión promedio de 71,6 y 58,7 letras ETDRS, respectivamente; Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

Después de doce meses, la media fue 2,44 (DE 1,72). La integridad estaba presente en 25,5% de los casos. Desestructuración leve en 10,6%, moderada en 4,2%, severa en 12,7% y total en 44,6%. La desestructuración severa suponía prácticamente 20 letras ETDRS de diferencia en la agudeza visual al año comparado con la de los otros pacientes (promedio de 56 y 75,6 letras ETDRS; Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$)

La variación media experimentada por la puntuación de la línea IS/OS a lo largo de los doce meses fue una mejoría de 0,6 puntos (DE 1,8). Sin embargo el intervalo abarca desde mejorar 4 puntos (pasar de desestructuración total a línea preservada) hasta empeorar 4 puntos. Un 55,3% de los pacientes conservan a los doce meses la misma puntuación que tenían al diagnóstico, un 10,6% empeora la situación de la línea IS/OS, y un 34% la mejora en su valoración por OCT. Es interesante reseñar que, de los 21 pacientes que parten de destrucción total de la línea IS/OS sin lograr mejoría tras la fase de carga, sólo tres lograron algún cambio al año. Este subgrupo de 21 pacientes presentaba agudezas visuales estadísticamente más bajas que el resto, tanto al final de la fase de carga (57,8 letras ETDRS *versus* 71,8, Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$), como al final del primer año (57,9 letras ETDRS *versus* 73,4, Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$).

No existe relación entre el número de *Lucentis*[®] recibido en el primer año y los cambios observados en la línea IS/OS (Rho de Spearman -0,07; $p = 0,64$). Tampoco se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre el número de inyecciones recibidas en el grupo que mantenía mejor estado de la línea IS/OS al cabo del año y los demás (valores medios 5,6 *versus* 5,9; ANOVA, $p = 0,5$).

En la Figura 4.29 se muestra la evolución del estado de la línea IS/OS a lo largo de doce meses. Como puede observarse, los cambios más importantes se detectan tras la fase de carga. El porcentaje de pacientes que presentan una línea IS/OS desestructurada al diagnóstico disminuye, y no se modifica posteriormente hasta el final del período de seguimiento. Después de los tres meses, la variación más notable es el aumento del número de pacientes en los que se detecta una línea IS/OS íntegra. Estos cambios favorables se reflejan en una disminución de la puntuación media.

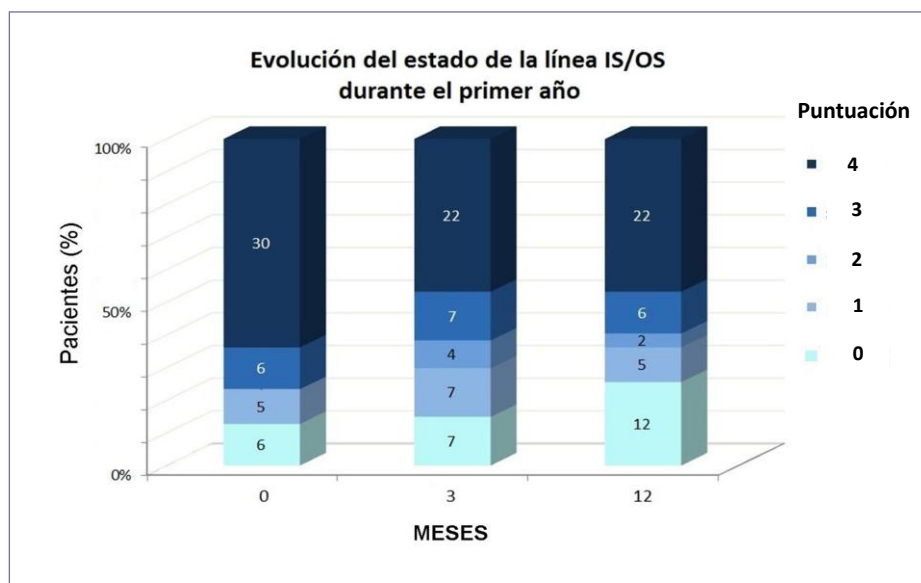


Figura 4.29.- Estado de la línea IS/OS en el momento del diagnóstico, tras la dosis de carga con ranibizumab y a los doce meses de seguimiento. Se indica el número de pacientes incluidos en cada una de las categorías según el estado de conservación de la línea IS/OS visualizado en las imágenes tomográficas (puntuación 0 a 4).

La Figura 4.30 muestra que la evolución del estado de la línea IS/OS es muy semejante a la observada para la agudeza visual, pero invertida. Estos resultados, junto con los presentados en la Figura 4.28, indican que el estado de conservación de la línea IS/OS condiciona de forma importante la función visual. Se ha investigado con el test de Pearson la relación entre ambas variables y los resultados se presentan en la Tabla 4.24. Existe una correlación negativa entre el estado la línea IS/OS y la agudeza visual al diagnóstico. Estos parámetros también se correlacionan estrechamente a los doce meses, a diferencia de lo que sucede con el CRT ($r = -0,27$; $p = 0,07$), lo que sugiere que la resolución del edema macular inducido por ranibizumab, y consiguiente disminución del CRT, es una condición necesaria pero no suficiente para la mejora de la agudeza visual.

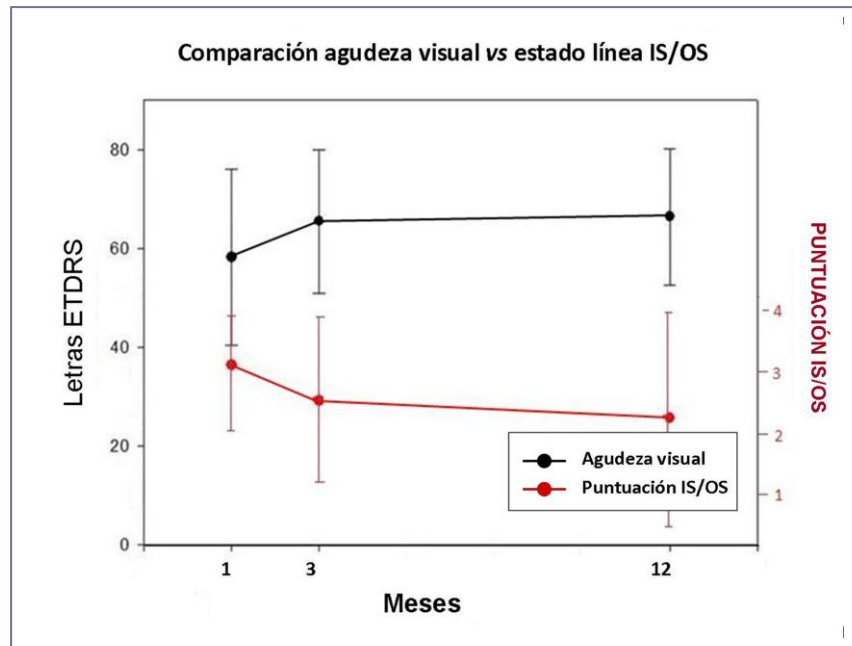


Figura 4.30.- Evolución de la agudeza visual en función del estado de conservación de la línea IS/OS (valores medios de la puntuación \pm DE) a lo largo de doce meses de seguimiento.

Tabla 4.24.- Correlaciones entre la agudeza visual (AV) y el estado de la línea IS/OS al diagnóstico, tras la fase de carga con ranibizumab y a los doce meses de seguimiento.

Estado de la línea IS/OS	AV	Correlación de Pearson	<i>p</i>	
<i>Al diagnóstico</i>	<i>Inicial</i>	-0,37	0,008	Si
<i>A los doce meses</i>	<i>Final</i>	-0,58	<0,0001	Si
<i>Al diagnóstico</i>	<i>Final</i>	-0,44	0,001	Si
<i>Tras la fase de carga</i>	<i>Final</i>	-0,53	<0,0001	Si

El estado de la línea IS/OS se ha evaluado como se indica en la sección 3.2.4 de Materiales y Métodos otorgando una puntuación de 0 a 4 en función del estado de conservación que se observa en las tomografías obtenidas con Spectralis.

El estado de la línea IS/OS en el momento inicial y tras la dosis de carga se relacionan con la agudeza visual final, de forma que una línea IS/OS bien preservada, que refleja integridad de los fotorreceptores, puede ser un factor pronóstico de una buena función visual. A continuación se muestran algunos ejemplos de distintas evoluciones de la línea IS/OS.

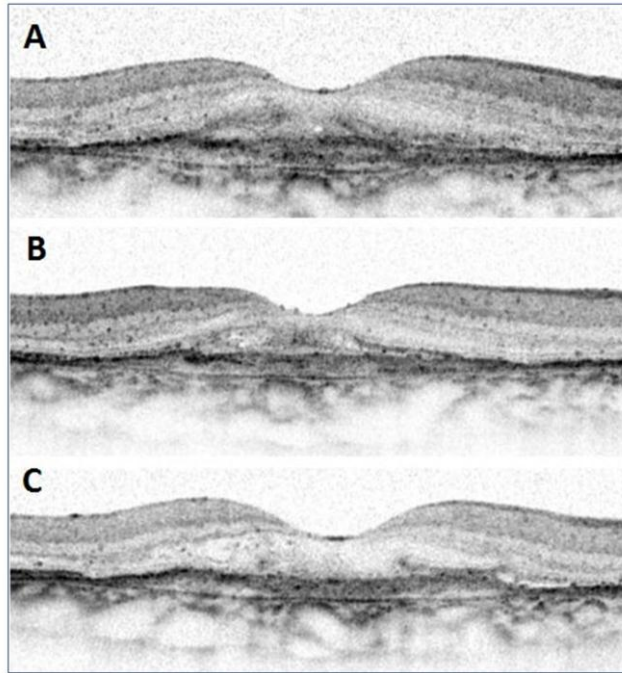


Figura 4.31.- Paciente que presenta línea IS/OS deteriorada al diagnóstico (A), que no mejora tras la fase de carga (B) ni al final del primer año (C). Agudeza visual inicial: 68. Tras fase de carga: 65. Al final del primer año: 56. Número de tratamientos durante el primer año: 7.

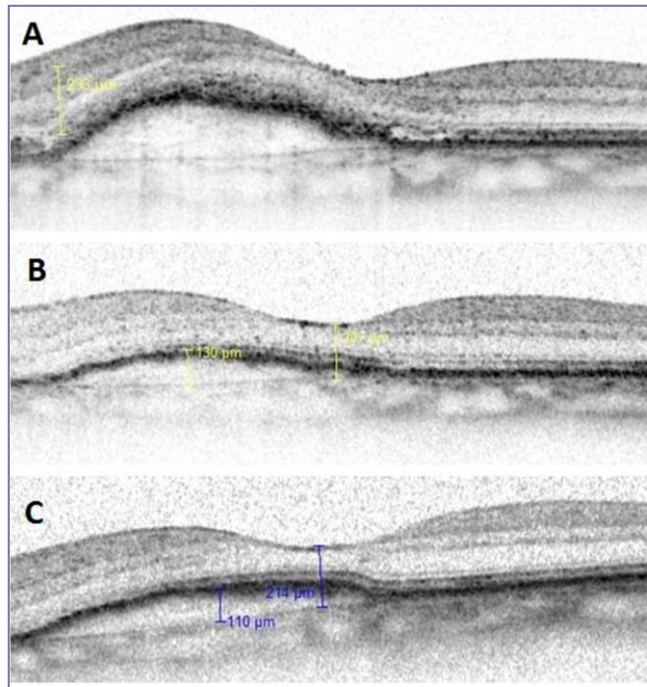


Figura 4.32.- Imágenes tomográficas de un paciente en las que se visualiza la línea IS/OS deteriorada al diagnóstico (A), que mejora tras la fase de carga (B), manteniendo la mejoría al final del primer año (C). Agudeza visual inicial: 60. Tras fase de carga: 65. Al final del primer año: 79. Número de tratamientos durante el primer año: 4.

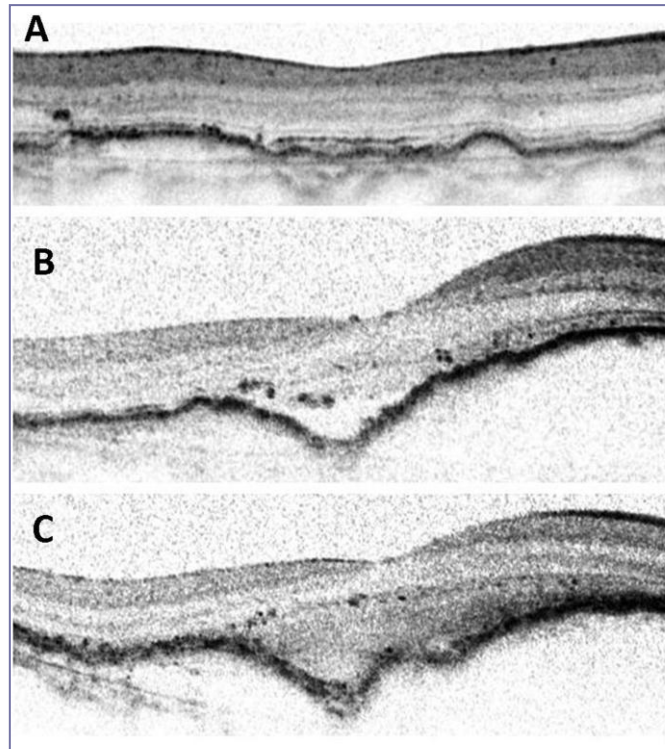


Figura 4.33.- Línea IS/OS de un paciente aceptablemente preservada al diagnóstico (A), que empeora tras la fase de carga (B) y aún más al final del primer año (C). Agudeza visual inicial: 75. Tras fase de carga: 65. Al final del primer año: 57. Número de tratamientos durante el primer año: 9.

4.5.1.4.- Línea de la membrana limitante externa (MLE)

En cuanto a la membrana limitante externa (MLE), el valor medio al diagnóstico fue de 1,76 (DE 1,76). En ese momento, la mayor integridad de la MLE no se relaciona con mejor visión, contrariamente a lo que sucedía con la línea IS/OS. Así, en los pacientes con desestructuración de la línea MLE, la visión media fue de 55 letras, y la de los pacientes con mayor conservación fue de 59,6 (ANOVA, $p = 0,4$). Al final de la fase de carga, el valor medio fue 1,29 (DE 1,53). Un 14,9% de la muestra (siete pacientes) presentaban daño severo de la MLE y diferencias en la visión respecto a los otros pacientes con mejor conservación de la línea (48,7 *versus* 68,5; ANOVA, $p < 0,001$). Pasados doce meses, la media fue 1,63 (DE 1,58). También existe una diferencia menor, pero significativa, entre la visión del grupo con desestructuración total y el resto de pacientes (56,1 *versus* 68,9; ANOVA, $p = 0,01$).

Considerando globalmente a todos los pacientes, no se encontró relación entre el número de *Lucentis*[®] recibidas y la mejoría en el estado de la membrana limitante externa (Rho de Spearman -0,02; $p = 0,9$). Por otra parte, no se detectan diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos de pacientes con línea MLE dañada y más preservada respecto al número de tratamientos al final del primer año (6,5 *versus* 5,7; ANOVA, $p = 0,2$).

En la Figura 4.34 se muestra la evolución del estado de la línea MLE a lo largo de doce meses. Mientras que la línea IS/OS se visualizaba al diagnóstico completamente desestructurada en un 63,8% de los pacientes (véase Figura 4.29), la línea MLE sólo se encontraba en este estado en el 29,7% de la muestra. Esto indica que el grado de preservación de la MLE en la DMAE es mayor que el de la línea IS/OS, como refleja un menor valor medio de la puntuación (1,76 vs 3,04). Por otra parte, la línea MLE parece ser menos plástica que la línea IS/OS ya que la puntuación media a los doce meses ($1,63 \pm 1,58$) no es significativamente distinta de la inicial ($1,76 \pm 1,76$). La máxima mejoría observada fue de 4 puntos, al igual que sucedía en la línea IS/OS.

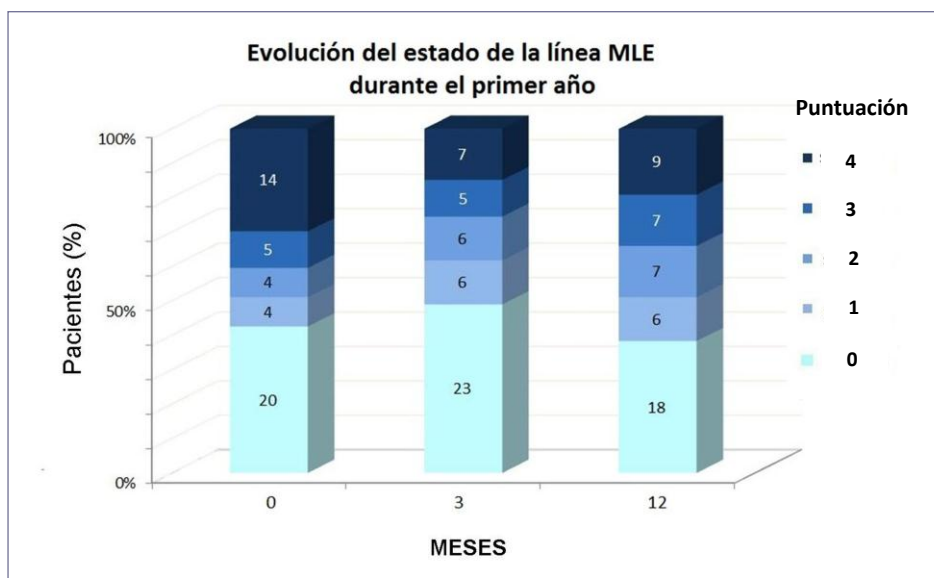


Figura 4.34.- Estado de la línea MLE en el momento del diagnóstico, tras la dosis de carga con ranibizumab y a los doce meses de seguimiento. Se indica el número de pacientes incluidos en cada una de las categorías según el estado de conservación de la línea MLE visualizado en las imágenes de Spectralis.

En la Tabla 4.25 se recoge el porcentaje de pacientes que mejoran, mantienen o empeoran las líneas IS/OS y MLE tras la dosis de carga y a los doce meses, respecto a su situación al diagnóstico. La Tabla 4.26 muestra la correlación entre el estado de conservación de la línea MLE y la agudeza visual al diagnóstico, tras la fase de carga y a los doce meses.

Tabla 4.25.- Evolución del estado de las líneas IS/OS y MLE en los pacientes tras la dosis de carga y al final del primer año respecto a su situación al diagnóstico.

	Línea IS/OS	Línea MLE
A los 3 meses		
% que mejora	31,9	31,9
% estable	57,4	59,6
% que empeora	10,6	8,5
A los 12 meses		
% que mejora	34,1	21,3
% estable	55,3	53,2
% que empeora	10,6	25,5

Tabla 4.26.- Correlaciones entre la agudeza visual (AV) y el estado de la línea MLE al diagnóstico, tras la fase de carga con ranibizumab y a los doce meses de seguimiento.

Estado de la línea MLE	AV	Correlación de Pearson	<i>p</i>	
<i>Al diagnóstico</i>	<i>Inicial</i>	-0,28	0,06	No
<i>A los doce meses</i>	<i>Final</i>	-0,54	<0,0001	Si
<i>Al diagnóstico</i>	<i>Final</i>	-0,49	0,0004	Si
<i>Tras la fase de carga</i>	<i>Final</i>	-0,46	0,001	Si

El estado de la línea MLE se ha evaluado como se indica en la sección 3.2.4 de Materiales y Métodos otorgando una puntuación de 0 a 4 en función del estado de conservación que se visualiza en las tomografías obtenidas con Spectralis.

Respecto a los cambios de los parámetros morfológicos, indican que el tratamiento con ranibizumab induce una mejora del estado de las estructuras retinianas, y más concretamente, de los fotorreceptores. Tras la dosis de carga, un 90-91% de los pacientes consigue mejorar o conservar el estado de las líneas IS/OS y MLE respecto a su situación al diagnóstico. A los doce meses, este porcentaje se mantiene para la línea IS/OS aunque desciende al 75% respecto a la línea MLE.

Ninguno de los 15 pacientes (32% de la muestra) con evolución favorable de la línea IS/OS tras la fase de carga presentaba desestructuración en ese momento de la línea MLE, y en un 60% de ellos la conservación de dicha línea era perfecta. Al final de los doce meses, un total de 16 pacientes mejoraron en algún grado su línea IS/OS con respecto al diagnóstico. Nuevamente, ninguno de esos 16 pacientes tenía la MLE desestructurada y un 56% la tenían perfectamente conservada. Así, parece que la conservación de la línea MLE es un requisito imprescindible para la mejoría de la línea IS/OS inducida por el tratamiento con ranibizumab. En el otro extremo, hay siete pacientes con desestructuración de la línea MLE al final de la fase de carga. Ninguno había mejorado su puntuación IS/OS y en todos ellos, éste era 4. Al final de los doce meses, la situación se repite con nueve pacientes. Sin una línea MLE preservada, la línea IS/OS ni mejora, ni se conserva.

La importancia del estado de conservación de la línea MLE para la función visual se deduce a partir de los coeficientes de correlación entre este parámetro morfológico y la agudeza visual (Tabla 4.26). De hecho, la relación entre el estado inicial y la agudeza visual final es más fuerte que la de la línea IS/OS ($R = -0,49$; $p = 0,0004$ versus $R = -0,44$; $p = 0,001$). En consecuencia tanto el estado basal de la línea IS/OS, como el de la línea MLE, parecen tener valor como factores pronóstico de la función visual. Es curioso que al diagnóstico no se encuentre correlación entre el estado de la MLE y la agudeza visual, lo cual es coherente con la observación de que no haya diferencias significativas entre la visión media de los pacientes con desestructuración total de la línea y los que presentan mayor conservación (55 vs 59,6 letras ETDRS). Una posible explicación es que otros factores, como la presencia de edema macular y/o la desestructuración de la línea IS/OS en el momento inicial, van a afectar negativamente a la visión con independencia del estado de conservación de la MLE.

4.5.1.5.- Líquido subretiniano (LSR) y desprendimiento del epitelio pigmentario (DEP)

De las tomografías iniciales también se ha recogido la presencia de desprendimiento del epitelio pigmentario (DEP) y líquido subretiniano (LSR). Al diagnóstico, 29 pacientes (61,7%) tenían DEP y 39 pacientes (82,97%) tenían LSR. Combinando ambas características: 23 pacientes tenían DEP y LSR; 6 tenían DEP, pero no LSR; 16 tenían LSR pero no DEP y en 2 no había ni DEP ni LSR (Figura 4.35).

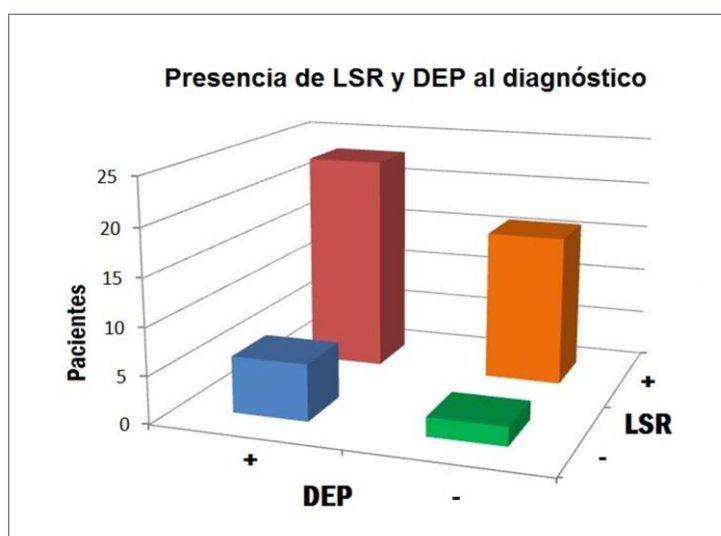


Figura 4.35.- Localización tomográfica al momento del diagnóstico de fluido subretiniano (LSR) y desprendimiento del epitelio pigmentario (DEP) en los pacientes de la muestra.

La agudeza visual de presentación tiende a ser mayor en aquellos pacientes en que existía DEP que en aquellos en que no lo había (61,5 versus 52,9 letras, ANOVA, $p = 0,1$), probablemente porque el complejo EPR-fotorreceptores se mantiene agrupado con más frecuencia cuando el líquido se encuentra bajo el EPR. En los grupos con y sin LSR en la tomografía basal, la visión era similar (57,9 versus 60,1; ANOVA, $p = 0,7$).

Se investigó si existía una relación entre la presentación con líquido subretiniano o DEP al diagnóstico y el número de retratamientos a lo largo del primer año. Tanto para los pacientes que debutaron con LSR, como para los que no, la media de retratamientos fue de 2,8 (DE 2 y 1,5, respectivamente) (test ANOVA; $p = 0,9$). Por tanto, la presencia de LSR no se correlaciona con el número de retratamientos.

Sin embargo, cuando se clasificaba la muestra entre los pacientes que se presentaban con DEP al inicio y los que no, la media de retratamientos para el primer grupo fue de 3,5 (DE 1,9) y para el segundo de 1,7 (DE 1,7). La diferencia fue estadísticamente significativa (ANOVA; $p = 0,002$) (Figura 4.36). Esta diferencia podría atribuirse a una tendencia del DEP a aumentar, con lo que se cumplirían criterios de retratamiento, o bien, a la decisión de retratamiento durante el seguimiento por la presencia del DEP.

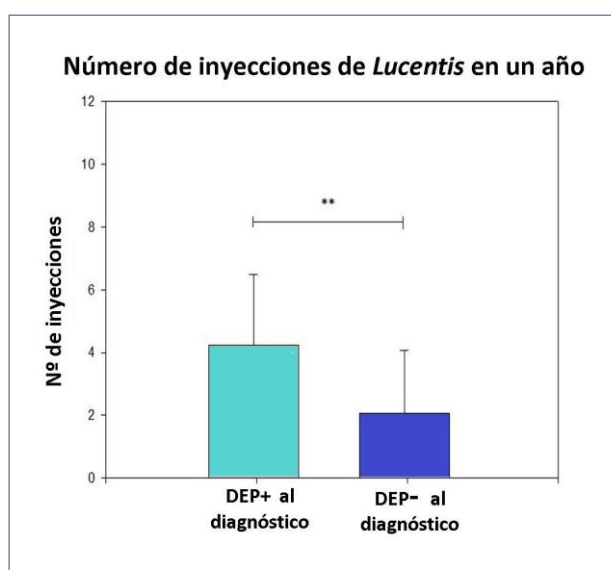


Figura 4.36.- Relación entre el número de retratamientos durante un año y presencia de desprendimiento del epitelio pigmentario en el momento del diagnóstico. Se representan medias \pm DE. ** $p < 0,01$.

4.5.2.- VALOR DE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS MACULARES DETERMINADOS POR SD-OCT COMO FACTORES PRONÓSTICO DE LA FUNCIÓN VISUAL

En los anteriores apartados, se ha determinado mediante el correspondiente análisis univariante que existe una correlación entre los siguientes parámetros tomográficos y la agudeza visual final:

- Al diagnóstico: CRT, estado de la línea IS/OS y estado de la línea MLE.
- Tras la fase de carga: estado de la línea IS/OS y estado de la línea MLE.

Para evaluar la contribución a la agudeza visual final de cada uno de los factores inicialmente identificados se la llevado a cabo un análisis de regresión lineal múltiple. El objetivo es identificar a aquellos con verdadero valor predictivo de los resultados funcionales

del tratamiento con ranibizumab durante un año. Dado que el número de pacientes en este apartado de la investigación es más modesto, se ha limitado el número de variables a incluir en el análisis de regresión múltiple. Se analizaron: la agudeza visual en el momento del diagnóstico, el estado de la línea IS/OS en el momento del diagnóstico y al final de la fase de carga, el estado de la línea MLE en el momento del diagnóstico y al final de la fase de carga, y el grosor retiniano central al diagnóstico.

Se seleccionaron para su introducción en el modelo: el estado de la línea MLE al diagnóstico (Kruskal-Wallis, $p = 0,0035$), el estado de la línea IS/OS al finalizar la fase de carga (Kruskal-Wallis, $p = 0,0037$), el grosor retiniano central al diagnóstico y la agudeza visual al diagnóstico. Las variables se fueron eliminando del modelo ordenadamente conforme a su significación dentro del mismo. Finalmente, el modelo definitivo para la variable dependiente “cambio en la agudeza visual a un año” queda constituido, incluyendo la agudeza visual en el momento del diagnóstico y el estado de la línea IS/OS al final de la fase de carga.

<i>Cambio en la agudeza visual a doce meses</i>				
Valor p del modelo	< 0,0001			
Coefficiente de determinación R^2	0,53			
R^2 ajustado	0,51			
Ecuación de regresión	<i>Coefficiente</i>	<i>Error estándar</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Agudeza visual al diagnóstico	0,4	0,08	24,13	<0,0001
IS/OS tras fase de carga	-3,4	0,95	12,67	0,0009

La ecuación genérica del modelo ajustado sería:

$$\text{Agudeza visual final} = 51,7 + 0,4 \times \text{Agudeza visual inicial} - 3,4 \times \text{Estado de IS/OS tras fase de carga}$$

Así, a mayor agudeza visual inicial y a mejor estado de conservación de la línea IS/OS al finalizar la fase de carga, mayor agudeza visual final.

4.5.3.- INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS Y402H Y A69S SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y SU RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB

Se ha investigado si los polimorfismos Y402H (gen *CFH*) y A69S (gen *LOC387715/ARMS2*) pueden influenciar las características de la morfología macular en el momento del diagnóstico y la respuesta de los parámetros tomográficos al tratamiento con ranibizumab. La muestra estaba constituida por los 47 pacientes para los que se dispone de registros tomográficos con Spectralis (SD-OCT) desde el momento del diagnóstico.

4.5.3.1.- Polimorfismo Y402H

La Tabla 4.27 recoge los valores de los parámetros tomográficos al diagnóstico y a los doce meses en función del genotipo para el polimorfismo Y402H del gen *CFH*. El genotipo TT (*wild type*) se hallaba en 10 pacientes, el CC en 11 y 26 eran heterocigotos.

Tabla 4.27.- Parámetros tomográficos y su respuesta al tratamiento con ranibizumab en función del genotipo para el SNP Y402H.

Genotipo para el polimorfismo Y402H				
Parámetros tomográficos	TT n = 10	TC n = 26	CC n = 11	P (ANOVA)
Al diagnóstico Valores (DE)				
CRT (<i>micras</i>)	466,7 (264,7)	386,3 (190,1)	424,3 (226,5)	0,50
Altura alt. maculares (<i>micras</i>)	335 (223,3)	280,9 (181,4)	287 (196,9)	0,75
Extensión lesión (<i>micras</i>)	3203,3 (1336,4)	3217,9 (925,9)	2675,3 (1187,0)	0,36
Línea IS-OS (<i>puntuación</i>)	3 (1,6)	3,4 (1,3)	2,27 (1,7)	0,12
Línea MLE (<i>puntuación</i>)	2 (1,8)	2 (1,8)	1 (1,5)	0,30
A los 12 meses Valores (DE)				
CRT (<i>micras</i>)	360 (204,9)	302,6 (141,9)	336,5 (247,2)	0,70
Altura alt. maculares (<i>micras</i>)	297,4 (195,7)	221,2 (168,1)	201,5 (127,5)	0,37
Extensión lesión (<i>micras</i>)	2866,6 (1560,5)	2814,9 (936,2)	2476,6 (1642,7)	0,72
Línea IS-OS (<i>puntuación</i>)	2,5 (1,8)	2,3 (1,8)	2,8 (1,5)	0,68
Línea MLE (<i>puntuación</i>)	1,2 (1,5)	1,8 (1,6)	1,6 (1,6)	0,60

Ni al diagnóstico, ni a los doce meses, se detectan diferencias significativas en los parámetros tomográficos en función del genotipo para el polimorfismo Y402H. Sin embargo es interesante que a los doce meses de la terapia antiangiogénica, el valor promedio de la puntuación de la línea IS/OS disminuye en los pacientes con genotipo TT (*wild type*) y en los heterocigotos TC, mientras que aumenta en los homocigotos para el alelo C de riesgo. Como muestra la Figura 4.37, cuando se compara la variación de la puntuación en el grupo CC respecto a la de los grupos TT y TC combinados, la diferencia alcanza significación estadística (ANOVA, $p = 0,01$).

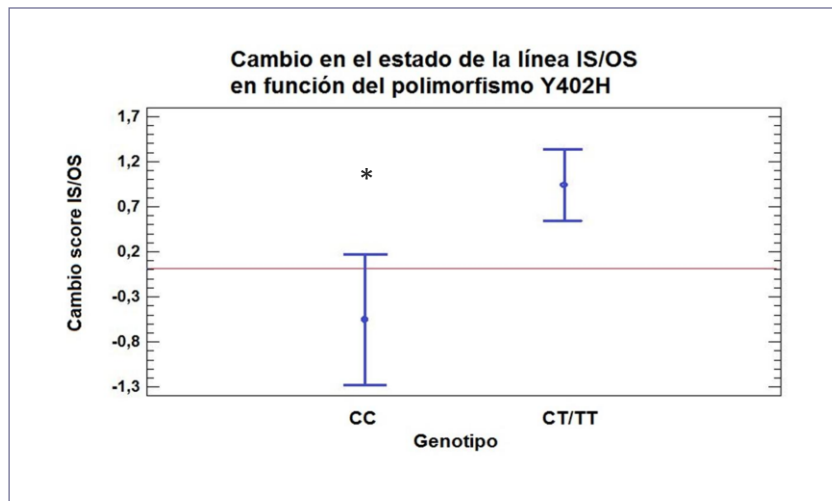


Figura 4.37.- Cambios en el estado de conservación de la línea IS/OS en función del genotipo para el polimorfismo Y402H. Se representan las diferencias entre los valores medios de la puntuación al momento del diagnóstico y a los doce meses para el grupo CC y los grupos combinados CT+TT como medias \pm DE. * $p < 0,01$.

Este resultado sugiere que el alelo de riesgo C en homocigosis puede influir negativamente sobre la evolución del estado de conservación de la línea IS/OS, y por tanto sobre la integridad de los fotorreceptores, lo que podría justificar por qué los pacientes que poseen el genotipo CC consiguen menor ganancia de agudeza visual tras tratamiento a un año (véase sección 4.4.4.1).

4.5.3.2.- Polimorfismo A69S

La Tabla 4.28 muestra los valores de los parámetros tomográficos al diagnóstico y a los doce meses en función del genotipo para el polimorfismo A69S del gen *LOC387715/ARMS2*. El genotipo GG (*wild type*) se hallaba en 21 pacientes, el TT en 9 y 17 eran heterocigotos. Tampoco en este caso se detectan diferencias significativas en los parámetros tomográficos en función del genotipo para el polimorfismo A69S ni al diagnóstico, ni a los doce meses. Respecto a la puntuación media de la línea IS/OS, mejora en todos los grupos tras doce meses de terapia con ranibizumab, sin que existan diferencias significativas entre grupos respecto a la magnitud de los cambios. Este resultado indica que el genotipo para este polimorfismo no influye en la evolución del estado de conservación de los fotorreceptores, lo que es coherente con el hecho de que el genotipo para el polimorfismo A69S no presenta asociación con la respuesta funcional a la terapia con ranibizumab en términos de mejoría de agudeza visual (véase sección 4.4.4.2).

Tabla 4.28.- Parámetros tomográficos y su respuesta al tratamiento con ranibizumab en función del genotipo para el SNP A69S.

Genotipo para el polimorfismo A69S				
Parámetros tomográficos	GG n = 21	GT n = 17	TT n = 9	P (ANOVA)
Al diagnóstico Valores (DE)				
CRT (<i>micras</i>)	339,9 (95,3)	476 (261,5)	460,8 (278,3)	0,11
Altura alt. maculares (<i>micras</i>)	268,8 (174,9)	298,8 (187,7)	343,3 (242,4)	0,62
Extensión lesión (<i>micras</i>)	2939,3 (924,9)	3235,2 (1152,3)	3155,9 (1360,8)	0,70
Línea IS-OS (<i>puntuación</i>)	2,9 (1,6)	2,9 (1,7)	3,6 (0,5)	0,39
Línea MLE (<i>puntuación</i>)	1,6 (1,8)	1,7 (1,8)	2,0 (1,6)	0,90
A los 12 meses Valores (DE)				
CRT (<i>micras</i>)	260,9 (70,5)	375,3 (236,1)	367,5 (218,8)	0,11
Altura alt. maculares (<i>micras</i>)	211,7 (169,9)	228,5 (156,3)	290,0 (180,9)	0,50
Extensión lesión (<i>micras</i>)	2677,8 (1047,3)	2757,6 (1412,3)	2887,1 (1489,5)	0,91
Línea IS-OS (<i>puntuación</i>)	2,2 (1,8)	2,5 (1,8)	2,8 (1,5)	0,60
Línea MLE (<i>puntuación</i>)	1,6 (1,4)	1,6 (1,8)	1,8 (1,7)	0,90

5. DISCUSSION

DISCUSIÓN

La discusión se ha estructurado en cinco bloques. En primer lugar se analiza el significado clínico de los resultados obtenidos en el estudio de la reproducibilidad de las medidas con el equipo de SD-OCT Spectralis-HRA. Los otros cuatro bloques se refieren a los tres estudios incluidos en la Tesis Doctoral. El primero de ellos corresponde al estudio E1, el segundo al E2, y en los bloques tercero y cuarto se discuten los resultados del estudio E3 en su doble vertiente: mejora funcional y morfología macular. En cada uno de ellos se resumen y analizan los resultados obtenidos, se valora su relevancia a la vista de los actuales conocimientos y se discute su repercusión en la práctica clínica y manejo de los pacientes con degeneración macular asociada a la edad, respecto a la cirugía de cataratas y la terapia antiangiogénica con ranibizumab intravítreo.

5.1.- CALIDAD DE LAS MEDIDAS DEL ESPESOR RETINIANO CENTRAL REALIZADAS CON SPECTRALIS SD-OCT EN PACIENTES CON DMAE NEOVASCULAR

El espesor retiniano central (CRT) es uno de los parámetros más frecuentemente usados en la práctica clínica, ya que un aumento de 100 o más micras es uno de los criterios que determinan la necesidad de retratamiento en los regímenes “a demanda”. Hay que señalar que este valor procede de los estudios realizados con los equipos de OCT de dominio temporal, en los que la variabilidad de las medidas es relativamente alta debido a las características de dichos equipos. Por ello, durante el seguimiento de los pacientes, no es posible distinguir si pequeñas variaciones en el CRT son atribuibles a la variabilidad en las medidas o a cambios en la morfología de la retina debidos al tratamiento o a recurrencia de la DMAE, y por esta razón es necesario establecer una magnitud de 100 micras como indicativo de cambio real. Con la OCT de dominio espectral, se han conseguido notables mejoras técnicas, lo que repercute en una mayor resolución y calidad de las imágenes tomográficas. Se ha demostrado que, la reproducibilidad intra e intersesión de las medidas del CRT en ojos sanos con equipos dotados de esta tecnología es excelente^{65, 261, 262}. Sin embargo, los estudios publicados acerca de la variabilidad de estas medidas en ojos con DMAE neovascular

utilizando la OCT de dominio espectral son escasos a pesar de la importancia del tema para el correcto seguimiento de los pacientes.

Nuestros resultados demuestran la alta reproducibilidad de las medidas del CRT con Spectralis en pacientes con DMAE neovascular. Los coeficientes de correlación intraclase (CCI) intraobservador e interobservador estimados (0,999-1,000) coinciden con los previamente publicados utilizando este equipo ²⁶⁴. En la Tabla 5.1 se recoge el valor del coeficiente de variación hallado en este estudio y los descritos para la medida de CRT con otros equipos de OCT con tecnología de dominio temporal o dominio espectral. La comparación es claramente favorable a Spectralis. En ojos normales también se ha comprobado que el coeficiente de variación para medidas repetidas con Spectralis (0,46%) es menor que los de otros equipos de OCT con tecnología de dominio espectral (entre 2,23% y 3.5%) ⁶⁵.

Tabla 5.1.- Coeficiente de variación hallado en este estudio para la medida del CRT en pacientes con DMAE neovascular con Spectralis y los descritos utilizando diferentes equipos de OCT.

Estudio	Equipo OCT	CoV (%)
Patel <i>et al.</i> ²⁶⁵	Stratus (TD-OCT)	9,6
Parravano <i>et al.</i> ²⁶⁶	Cirrus (SD-OCT)	4,15
Menke <i>et al.</i> ²⁶⁸	Topcon 3D-OCT 1000 (SD-OCT)	3,7
Este estudio	Spectralis (SD-OCT)	1,29

CoV: coeficiente de variación. Valores obtenidos con segmentación manual de las imágenes de OCT. TD-OCT, Equipo de OCT de dominio temporal; SD-OCT, Equipo de OCT de dominio espectral.

Probablemente la alta calidad de las medidas de Spectralis está relacionada no sólo con su elevada resolución y la rapidez en la adquisición de las imágenes sino con sus características singulares: el sistema *Tru Tracking*, que corrige los movimientos oculares durante el examen, y la función de seguimiento, que permite el reconocimiento automático de una localización exacta lo que minimiza la influencia de factores extrínsecos como fijación del paciente y habilidad del operador para colocar el sistema de barrido sobre la misma localización.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que variaciones de más de 23 micras en el CRT son indicativos de cambios reales debidos a la evolución de la patología macular y no a

la variabilidad test-retest de las medidas. Este valor es similar a los hallados por otros investigadores que han descrito que, en imágenes de Spectralis y Cirrus sin errores de segmentación, una modificación del espesor retiniano central de más de 20²⁶⁴ o 26 micras²⁶⁶, refleja un cambio patológico con una probabilidad del 95%. En comparación, el límite de detección con Stratus es de 100 micras^{265, 267}. A la vista de estos datos, parece clara la conveniencia de revisar el criterio basado en el aumento de al menos 100 micras en el CRT para establecer la necesidad de retratamiento de los pacientes con DMAE neovascular en los regímenes “a demanda”. Con la tecnología de SD-OCT, cambios en el CRT del orden de 30 micras en imágenes sin errores de segmentación serían clínicamente significativos.

La principal limitación de este estudio es que el número de la muestra no permite la estratificación en cuanto a la naturaleza de la neovascularización coroidea. Considerando que se ha descrito diferente historia de la enfermedad para algunos subtipos (como, por ejemplo, un crecimiento más agresivo para las membranas clásicas y uno más discreto para las ocultas), y que la morfología observable por tomografía es distinta también, lo que afecta a la segmentación de la imagen, es probable que la variabilidad de las medidas de espesor retiniano esté en relación con los subtipos de DMAE neovascular. Por otra parte, la proporción de componente fibroso y la distribución de líquido retiniano en cada una de las lesiones no fueron registradas y podría haber afectación diferencial en el trazado de las líneas de referencia.

Finalmente, hay que señalar que se han calculado la repetibilidad y la reproducibilidad de las medidas del espesor retiniano central, y no la medida de otras localizaciones, puesto que en esta Tesis se ha utilizado siempre el CRT aunque quizá sería interesante registrar los parámetros de grosor en cada uno de los sectores maculares para evaluar posibles variaciones de la repetibilidad de estas determinaciones.

En conclusión, las medidas del CRT obtenidas con Spectralis-HRA en pacientes con DMAE neovascular son altamente reproducibles. Cambios del espesor retiniano central del orden de 25-30 micras, medidos con este equipo de SD-OCT, son clínicamente significativos. Por ello, se propone la revisión del criterio de retratamiento de los pacientes con DMAE (aumento de al menos 100 micras) utilizado en los regímenes “a demanda”.

5.2.- CIRUGÍA DE CATARATAS MEDIANTE FACOEMULSIFICACIÓN COMO FACTOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE NEOVASCULARIZACIÓN COROIDEA

5.2.1.- LA FACOEMULSIFICACIÓN NO AUMENTA EL RIESGO DE NVC

La cirugía de cataratas es hoy día la única opción terapéutica cuando la opacidad del cristalino causa una pérdida significativa de la agudeza visual, y están bien establecidos los beneficios de la intervención con respecto a la función visual de los pacientes. Sin embargo, se ha descrito en diversos estudios⁹⁰⁻¹⁰¹ que la cirugía de cataratas es un factor de riesgo para el desarrollo de DMAE neovascular, en particular en pacientes con DMAE incipiente. Esta cuestión es importante en la práctica clínica ya que las cataratas y la DMAE se presentan a menudo de forma concurrente en personas ancianas dado que ambas patologías están asociadas a la edad.

Los resultados de este estudio demuestran que la cirugía de cataratas mediante facoemulsificación no supone un riesgo de desarrollo de neovascularización coroidea en el primer año postoperatorio ni en pacientes con mácula sana, ni en aquellos con DMAE incipiente. Tras la intervención, se consigue una mejora sostenida de la función visual en los dos grupos. La discrepancia entre nuestros resultados y los obtenidos en estudios previos puede deberse a distintos factores que se discuten a continuación.

Respecto a los estudios epidemiológicos, hay que considerar que sus conclusiones se obtienen tras comparar las incidencias o prevalencias de NVC en dos grupos de pacientes que inicialmente no presentaban NVC y que habían sido sometidos o no a cirugía de cataratas. En primer lugar, el carácter retrospectivo de muchos de estos estudios juega un papel decisivo en la valoración de la relación de causalidad puesto que no se conoce con precisión el estado de los ojos con anterioridad a la cirugía de cataratas.

En segundo lugar, también es importante el período de tiempo en que se observa la aparición de un determinado efecto. Así, en los estudios *Blue Mountains*⁹⁵ y *Beaver Dam*^{96, 96}, tiempos tan largos como diez y veinte años pueden hacer entrar en juego otros factores como la modificación en la cantidad de luz recibida por la retina y el cambio en las longitudes de onda que alcanzan ésta, según el tipo de lente implantada. Por ejemplo, en el *Beaver Dam*^{94,96},

los pacientes habían sido operados de cataratas antes del período de reclutamiento que comenzó en 1988, y aproximadamente un 25% de ellos tuvieron cirugía sin implante simultáneo de lente intraocular. Sin embargo, en el estudio *AREDS*¹⁰⁷, que encuentra beneficios de la operación de cataratas en pacientes con diferentes grados de severidad de DMAE, la probabilidad de que a un sujeto se le implantara una lente con filtro amarillo es mucho mayor dado que las cirugías se realizaron a partir de 1992. Esta fecha es posterior a las cirugías de los estudios *Beaver Dam*, *Blue Mountains* y *Salisbury*⁹⁷, todos los cuales describen que la cirugía de cataratas es un factor de riesgo para DMAE neovascular. Tampoco hay que olvidar que el propio paso del tiempo es el principal factor de riesgo para el desarrollo de DMAE en todas sus formas. Por ejemplo, en el *Los Angeles Latino Eye Study* (LALES)¹⁰¹, la existencia de catarata nuclear (no su cirugía) se asociaba con una mayor presencia de drusas blandas mal definidas. Si la presencia de éstas se ha considerado como factor de riesgo para la evolución a la forma neovascular, es una mera cuestión de tiempo que la NVC se desarrolle con independencia de que se opere o no la catarata.

Finalmente, también tienen relevancia las características de la población estudiada en cuanto a edad media y grado de severidad de la DMAE que presentan los sujetos del estudio. En primer lugar, la edad media va a determinar una mayor o menor prevalencia e incidencia de DMAE, tanto incipiente como en su forma neovascular, en todas las ramas del estudio que luego se pretenden comparar. En este sentido, los estudios epidemiológicos que han investigado la relación entre cirugía de catarata y DMAE son heterogéneos en cuanto a la edad de los pacientes estudiados. Respecto al grado de severidad de la patología, hay que tener en cuenta que cuanto más avanzada está la DMAE, mayor probabilidad tiene de evolucionar a formas neovasculares con independencia de la realización de la cirugía. En los distintos estudios, la proporción de individuos con diferentes grados de severidad de DMAE tanto en el grupo de pacientes sometidos a cirugía, como en el grupo de los controles no intervenidos, es muy diferente, lo que podría explicar en parte la variabilidad encontrada en cuanto a porcentajes de progresión a DMAE neovascular.

Este tipo de limitaciones se han tenido en cuenta en el diseño de la presente investigación. Un estudio unicéntrico y de carácter prospectivo como el presente no puede competir en número de pacientes con el resultante de agrupar varios estudios poblacionales

pero la metodología aplicada, la estabilidad de los criterios de definición, y la homogeneidad de la técnica quirúrgica realizada pueden ser controladas más estrechamente. En todo caso, nuestro estudio se compara favorablemente con los estudios clínicos de carácter prospectivo previamente publicados, que también han examinado la relación entre cirugía de cataratas y DMAE neovascular. Frente a los estudios de Pollack *et al.*^{91,92}, Armbrecht *et al.*¹⁰⁸) Dong *et al.*¹¹¹ y Hooper *et al.*¹¹² que incluían a 47, 40, 71 y 29 pacientes operados, respectivamente, esta investigación contó con 172 pacientes, 79 de ellos con DMAE incipiente, que fueron operados tras una exploración preoperatoria minuciosa, y seguidos durante un año con la misma metodología. De acuerdo con otros autores¹¹⁰, se ha estimado que un año es un período de seguimiento razonable para la manifestación de un posible evento como consecuencia directa de la manipulación quirúrgica. Como ya se ha comentado, períodos más largos podrían enmascarar los efectos de la cirugía por la posibilidad de que otros factores contribuyesen al efecto observado. En el estudio de Hooper *et al.*¹¹², el período de seguimiento fue de seis meses que consideramos demasiado restrictivo ya que podría subestimar el efecto deletéreo directo de la cirugía sobre la retina. La edad media de nuestros pacientes, semejante en los dos grupos, fue de 75 años que resulta adecuada para las patologías que nos ocupan. Los pacientes del grupo *Di* presentaban en su mayoría DMAE bilateral simétrica (80%). Después del reclutamiento, se excluyó a aquellos sujetos que presentaban grados mínimos de DMAE o un riesgo máximo de progresión para eliminar la variabilidad de la enfermedad como factor de error. Ninguno de los participantes en el estudio mostraba NVC en el ojo adelfo.

En esta investigación no se ha incluido un grupo compuesto por pacientes con características similares a los estudiados (i. e. con mácula sana y con DMAE incipiente) a los que no se opera de catarata y solamente se hace seguimiento durante un año. En primer lugar, no se ha considerado necesario ya que, así como hay gran controversia en cuanto a la relación catarata-DMAE exudativa, los porcentajes de pacientes que evolucionan a formas neovasculares a un año de seguimiento en ausencia de cirugía de catarata son similares en todos los estudios cuando la edad es comparable, en un intervalo entre 2 y 5%^{91, 92, 107, 108, 110, 111}. Además no sería ético diferir la cirugía un año a este grupo control teniendo en cuenta que el tiempo de espera ordinario para los pacientes remitidos a nuestro Servicio para intervención es inferior a un mes.

La principal fortaleza de nuestro estudio es que por primera vez se ha utilizado la OCT como técnica adicional de evaluación preoperatoria y de seguimiento para la detección de cambios en los pacientes operados. En los estudios publicados hasta la fecha sobre este tema tanto prospectivos, como retrospectivos, se han empleado fotografías de modo rutinario, angiografía en caso de dudas o como parte de la exploración basal, aunque raramente como prueba sistemática en todas las visitas, y el verde de indocianina casi de forma anecdótica. Todos nuestros pacientes fueron examinados el mismo día de la cirugía con OCT de dominio espectral, que ofrece mayor rendimiento y resolución que los modelos previos de dominio temporal, y de nuevo al mes y al año de la cirugía mediante el sistema de seguimiento que permite la obtención de imágenes superponibles mediante la selección de zonas de referencia que se mantienen constantes en la retina de los individuos.

Hay que destacar que dentro de nuestro grupo de DMAE, había un 17% de la muestra cuyo estado macular preoperatorio no podía ser adecuadamente valorado por retinografía debido a la opacidad de medios, mientras que sólo un 2% de los pacientes tenían un grado de catarata tal que impedía la obtención de imágenes OCT de suficiente calidad. Esto permitió, por una parte, una valoración macular que no habría sido posible de otro modo y, por otra, facilitó la inclusión de estos pacientes con catarata madura en el estudio. Vale la pena recordar que pacientes con catarata madura fueron excluidos de otros estudios cuando estaba muy dificultada la obtención de fotografías o angiografías de fondo de ojo, con lo que la selección de pacientes tenía cierto sesgo.

Además, la posibilidad de adquirir imágenes con resolución próxima a las cuatro micras, permitió excluir con mayor certeza la presencia de DMAE neovascular al inicio del estudio. En el apartado de resultados, se muestra la fotografía de fondo de ojo del paciente con NVC previa a la cirugía (véase Figura 4.4). A partir de estas imágenes hubiera sido realmente difícil diagnosticar la membrana. Si este paciente, que no presentaba signos aparentes de NVC, hubiera sido incluido en nuestro estudio, la tasa aparente de progresión a NVC durante el período de seguimiento habría sido del 1,25%.

Otros estudios clínicos han descrito que las tasas de progresión a DMAE neovascular son significativamente más altas en los pacientes con DMAE sometidos a cirugía de cataratas

que en los controles no operados. Así, en pacientes con DMAE bilateral moderada sometidos a extracción extracapsular unilateral, Pollack *et al.*⁹¹ hallaron que en el primer año postoperatorio, el 19,1% de los ojos operados progresaban a DMAE neovascular, mientras que esta proporción era del 4,3% en los adelfos control. Sin embargo, en este trabajo se agruparon datos de pacientes estudiados prospectivamente (36) con otros analizados retrospectivamente (11) en los cuales no se podía documentar la ausencia de NVC preoperatoria. En un estudio prospectivo con 71 pacientes con DMAE incipiente sometidos a cirugía de cataratas, Dong *et al.*¹¹¹ detectaron nueve casos que desarrollaron NVC (12,7%) en el seguimiento postoperatorio a un año. Cinco de los nueve casos se diagnosticaron con AFG en la primera semana postoperatoria. Es dudosa la relación causa-efecto en una membrana que aparece pocos días después de la cirugía sin mecanismo de agresión directo sobre la membrana de Bruch como el que se produce en los modelos animales de neovascularización inducida. Los propios autores consideran que estos pacientes deberían excluirse del estudio ya que probablemente la lesión estaba presente antes de la intervención sin ser visualizada en las imágenes preoperatorias por la opacidad de medios. Con esta corrección, la tasa de progresión a NVC se reduce al 4,6%, semejante a la calculada para una población general con DMAE de igual grado de severidad (< 5% para un año). En un estudio retrospectivo llevado a cabo con 1152 pacientes con DMAE incipiente sometidos a cirugía de cataratas, Baatz *et al.*¹¹⁰ detectaron 28 casos de neovascularización coroidea en el primer año post-cirugía, lo que supone una tasa de progresión del 2,43%. Sin embargo, en cuatro de estos casos la detección de la membrana tras la cirugía se produjo a tiempos precoces y no fue posible documentar el estatus basal.

En conjunto, estos resultados sugieren que un número de casos de supuesta progresión a DMAE neovascular tras cirugía de cataratas podrían estar presentes antes de la intervención sin ser reconocidos por la ausencia de un adecuado examen preoperatorio como el realizado en nuestro estudio. Otros dos estudios prospectivos con un reducido número de pacientes han incluido una valoración en la línea base mediante AFG para confirmar la ausencia o presencia de NVC. En el estudio de Armbrecht *et al.*¹⁰⁸, ninguno de los 40 pacientes con DMAE débil y moderada que se sometieron a cirugía de cataratas desarrolló neovascularización tras un período de un año. En el estudio de Hooper *et al.*¹¹², la AFG preoperatoria a todos los individuos reclutados permitió descartar a tres pacientes que

presentaban NVC no detectada en el examen clínico. A los seis meses de la cirugía, sólo uno de los 27 sujetos con DMAE de alto riesgo de progresión a NVC desarrolló neovascularización (3,7%).

Un factor común a nuestro estudio y los de Armbrrecht *et al.*¹⁰⁸ y Hooper *et al.*¹¹² es que todos los participantes fueron intervenidos mediante facoemulsificación. Esta técnica es menos agresiva que la extracción extracapsular del cristalino que ha sido el procedimiento más extendido durante muchos años. De hecho, en los grandes estudios epidemiológicos hay mezclados pacientes operados mediante extracción extracapsular de cataratas y otros mediante facoemulsificación. También fue el método utilizado en los estudios de Pollack *et al.*^{91,92}. Como indican los trabajos del profesor García Sánchez²⁶⁹, la extracción extracapsular de cristalino, incluso aunque se desarrolle sin complicaciones y en ausencia de Tyndall visible en la exploración, conlleva la rotura de la barrera hemato-acuosa que es detectable hasta tres meses después de la cirugía. El flare sigue siendo detectable a los seis meses de la cirugía. Además, existe una proporcionalidad entre el tamaño de la incisión empleada y el grado de inflamación. Con la mejora del procedimiento quirúrgico gracias al desarrollo de instrumental y de lentes cada vez más flexibles que permiten practicar incisiones más pequeñas, y las modernas técnicas de facoemulsificación, se consiguen menores niveles de inflamación. Esta diferencia puede estar relacionada con el bajo porcentaje de opacidad capsular observado en nuestro estudio al año (menor al 2%) en comparación con los valores reportados por Pollack *et al.*^{91, 92} (entre 11 y 15%). Considerando la implicación de la ruta del complemento en la patogénesis de la DMAE, sería razonable pensar que una reacción inflamatoria incrementada tras la cirugía de cataratas podría acelerar la progresión de una DMAE incipiente a su forma neovascular. Esto contribuiría a explicar la disparidad de resultados entre nuestro estudio (y los que también emplean facoemulsificación realizando un adecuado control preoperatorio) y aquellos en los que se llevó a cabo la extracción extracapsular de las cataratas.

5.2.2.- EFECTO DE LA FACOEMULSIFICACIÓN SOBRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS MACULARES

Dentro de las variables recogidas en el estudio, se han detectado cambios tanto en el espesor retiniano central como la altura máxima macular. Son cambios de pequeña cuantía,

pero estadísticamente significativos. Tras la cirugía de cataratas, se registra un aumento en el espesor de la fóvea de unas siete micras respecto al valor basal, que regresa en la visita del año. La altura máxima macular, que suele corresponder a la convexidad de la capa de fibras nerviosas en su trayecto hacia la papila, aumenta hasta once micras en el primer mes y se mantiene semejante al año (pequeña variación y no significativa estadísticamente). No creemos que se trate de un aumento en el contenido seroso de la mácula, a modo de edema difuso. Una explicación para este fenómeno la encontramos en los trabajos de Vizzeri *et al.* sobre glaucoma²⁷⁰ que investigaron la relación de la calidad de la imagen tomográfica para la valoración de la capa de fibras nerviosas y descubrieron que a mayor calidad de la imagen, mayor espesor de capa de fibras encontrado en el mismo sujeto en diferentes exámenes correlativos. La misma relación positiva entre fuerza de la señal y medida de capa de fibras ha sido descrita por Cheung *et al.*²⁷¹. La eliminación de catarata supone un incremento en la calidad de las imágenes obtenidas, que puede justificar estos hallazgos. Y un año después, la opacidad de la lente, aunque sea sutil y no clínicamente significativa en la mayor parte de los pacientes, restaría calidad a la imagen, invirtiendo ligeramente la tendencia. Diez micras de aumento no determinarían cambio en la actitud de seguimiento o terapéutica, pero conviene tener en consideración este efecto, que puede ser significativo en los pacientes con mayor opacidad prequirúrgica.

5.2.3.- RELEVANCIA DEL ESTUDIO PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA

Se ha hecho hincapié en la importancia del examen preoperatorio para diagnosticar correctamente a aquellos pacientes remitidos para cirugía de cataratas que pudieran presentar DMAE neovascular antes de la intervención. Las limitaciones inherentes a las técnicas convencionales usadas rutinariamente en la práctica clínica pueden dificultar este diagnóstico cuando la catarata interfiere en el examen de la retina.

Incluso en los Centros dedicados exclusivamente a la lectura de imágenes fotográficas pueden pasar inadvertidas alteraciones maculares debido fundamentalmente a la opacidad de medios. En este trabajo se presentan los valores de sensibilidad y especificidad calculados para la retinografía (no para el diagnóstico de membrana neovascular) para catalogar a los sujetos como normales o alterados antes y después de la cirugía, tomando como referencia la

tomografía. Se obtuvo un valor de especificidad del 77%, valor predictivo positivo de 67% y negativo del 90%. Los falsos negativos deben intentar minimizarse aunque se aumente el número de falsos positivos en esta patología si tiene en cuenta la importancia de no detectar a tiempo una membrana neovascular.

En cuanto a la AFG, si bien proporciona más información que la retinografía, también puede verse afectada en casos de intensa opacidad de medios. Además, no es un procedimiento idóneo para un cribado general por el tiempo que requiere la exploración y por su carácter invasivo. La excelente resolución de la OCT de dominio espectral, con altos valores de reproducibilidad, y su capacidad de discriminación aun en casos de severa opacidad de medios la convierten en un sistema de imagen sensible a la detección de los cambios y de fácil interpretación por parte del investigador, con el aporte de valores cuantitativos de intuitiva comprensión.

El diagnóstico precoz de la DMAE neovascular es fundamental para aplicar el protocolo de actuación adecuado y evitar la pérdida irreversible de visión. Dado que suele ser asimétrica, y el paciente pocas veces percibe la pérdida de agudeza visual de manera precoz, es importante que, cuando acude al oftalmólogo por disminución progresiva de visión y presenta cataratas, se descarte la presencia de DMAE neovascular, sin atribuir a la presencia de cataratas la visión perdida. Esto es especialmente relevante en los pacientes con catarata y en cualquier estadio de DMAE. En este caso podríamos jugar con diferentes escenarios:

- a) *No detectar la presencia de NVC y, sin tratarla, operar la catarata.* Las consecuencias de operar a estos pacientes son doblemente negativas. En primer lugar, se retrasa el diagnóstico de la verdadera patología causante de la disminución de la agudeza visual, permitiendo el crecimiento de la lesión. Por otra parte, se pueden enmascarar los síntomas si mejora la visión al retirarse la catarata, aunque existe la posibilidad incluso de profunda pérdida de visión tras la cirugía ¹¹¹.
- b) *Saber que el sujeto tiene DMAE no neovascular y catarata y no querer operarla, por el riesgo de inducir neovascularización.* Pollack ^{91,92} sostenía que hay dos razones para operar una catarata en estas condiciones cuando el riesgo de progresión es alto. Una, que la opacidad de medios impida valorar el fondo de ojo de manera adecuada. La otra, que la

opacidad de medios impida la aplicación de un tratamiento láser de la neovascularización caso de que ésta llegara a aparecer. Sin embargo, hemos visto que mediante la OCT es posible la valoración macular incluso en casos de catarata muy madura. Y gracias al desarrollo de las terapias antiangiogénicas intravítreas, no es necesaria la visualización de fondo de ojo al realizar el tratamiento, ya que no va dirigido contra la retina, sino que se deposita en la cavidad vítrea. Por otra parte, los resultados de nuestro estudio y los de Hooper *et al.*¹¹² demuestran que la facoemulsificación no induce neovascularización en pacientes con DMAE de riesgo moderado o alto de progresión a DMAE exudativa. Así, los argumentos de Pollack ya no son válidos hoy en día.

- c) *Se ha diagnosticado una DMAE neovascular y además el paciente tiene una catarata clínicamente significativa.* Furino *et al.*²⁷² han descrito que la operación de cataratas en sujetos con DMAE neovascular sin tratamientos previos, combinada con la administración inmediatamente posterior de Avastin, resulta en una mejora de la agudeza visual y disminución del espesor retiniano central. Sin embargo, esta respuesta se observó al mes de la intervención y no se han comunicado resultados respecto a la evolución a tiempos posteriores. Consideramos que en estos supuestos, es más prudente instaurar en primer lugar el tratamiento antiangiogénico y diferir la cirugía de cataratas al momento adecuado. A este respecto, se ha publicado recientemente que la cirugía de cataratas en pacientes con DMAE neovascular de la fase III de los estudios MARINA y ANCHOR tratados con ranibizumab es un procedimiento seguro y beneficioso para los pacientes en términos de ganancia de agudeza visual²⁷³. Los sujetos operados llevaban una media de trece inyecciones cuando se realizaba la cirugía sin requerir posteriormente más inyecciones que el ojo adelfo también afectado y no operado.

Lo expuesto anteriormente apoya la necesidad de establecer un diagnóstico precoz de DMAE neovascular que evite las demoras que pueden darse cuando se remite a un paciente para cirugía de catarata (los períodos varían de unos centros a otros). La OCT de dominio espectral puede ser una técnica idónea para este diagnóstico precoz. Posee excelente resolución y buena reproducibilidad. Tiene gran capacidad de penetración en casos de catarata madura y es asimismo capaz de detectar signos precoces de DMAE neovascular. Es un procedimiento rápido y la mayor parte de las veces no es necesaria la dilatación pupilar para la

obtención de imágenes maculares de suficiente calidad. No requiere el uso de contrastes ni procedimientos invasivos y es bien aceptado por los pacientes. La interpretación de las imágenes tomográficas no es especialmente compleja y dichas imágenes pueden ser enviadas sin perder valor (las fotografías tienen limitaciones a la hora de reflejar edema difuso y otras alteraciones que sí se detectan con facilidad en el examen de la lámpara de hendidura). Finalmente, permite la comparación general entre diversas visitas de manera bastante intuitiva para el operario y el paciente.

Por ello, proponemos la instauración de un programa de cribado mediante OCT sistemática para los pacientes con DMAE antes de ser referidos para cirugía de catarata, que podría ser llevado a cabo en ambulatorios. La población española mayor de 65 años asciende a 7.846.027 personas según los datos del Instituto Nacional de Estadística y se estima que en cuarenta años esta población se duplicará, pasando a representar el 30% de la población total. La prevalencia de DMAE para este grupo de personas asciende al 3,4%, y la total de MAE y DMAE alcanza el 13,7%⁶. Sobre estas bases podemos calcular que aproximadamente 267.000 personas presentan algún grado de DMAE y 1.075.000 maculopatía o degeneración macular asociada a la edad. Estas altas prevalencias también se encuentran para la diabetes mellitus. En concreto, el Di@bet.es Study²⁷⁴ ha estimado una prevalencia del 14% en la población española, por lo que puede calcularse que más de 6 millones de personas están afectadas de diabetes y precisan controles oftalmológicos periódicos. Para descargar a los hospitales de revisiones sin patología o que no precisa tratamiento o seguimiento especial, se ha desarrollado un sistema de cribado mediante retinografía por cámara no midriática que está ofreciendo buenos resultados en la actualidad. Un sistema semejante de cribado mediante OCT se podría implantar para los pacientes con DMAE antes de ser referidos para cirugía de catarata. Si se detectara neovascularización, los pacientes serían remitidos de manera preferente a las Unidades de Retina y Mácula para tratamiento hospitalario y, en caso de necesidad, se decidiría el mejor momento para la cirugía de catarata dentro del seguimiento. Si en la OCT no hubiera signos de NVC, se remitirá al paciente para facoemulsificación, en la medida de lo posible mediante microincisión. Parece prudente la implantación de lentes con filtro amarillo (a la espera de la publicación de datos sólidos que defiendan su uso). Estos pacientes con DMAE no neovascular, en vista de los resultados de nuestro estudio, podrían ser devueltos al ambulatorio, donde, en ausencia de sintomatología nueva, serían analizados

mediante OCT anual, con modo de seguimiento tomando como referencia el examen tomográfico preoperatorio. Cuando la OCT ofreciera imágenes dudosas, se remitirían las mismas a especialistas en DMAE para valoración y éstos decidirían si procede un examen del paciente con contraste angiográfico.

Con este sistema se conseguiría la descongestión de los hospitales que actualmente reciben cualquier caso de “maculopatía” aun cuando no se precise contraste. Además, los pacientes una vez operados de cataratas, no necesitarían ser revisados en el hospital a intervalos cortos para detectar posibles cambios.

En conclusión, la cirugía de cataratas, tal como se realiza en la actualidad, no está relacionada a corto-medio plazo con un aumento de la tasa de progresión de DMAE hacia formas neovasculares. El rendimiento de la OCT de dominio espectral como método de valoración se ha mostrado superior a la retinografía para la detección de NVC en los pacientes con DMAE remitidos para cirugía de cataratas. Se propone la realización sistemática de OCT a estos pacientes como parte del estudio preoperatorio.

5.3.- LOS POLIMORFISMOS Y402H (CFH) Y A69S (LOC387715/ARMS2) ESTÁN ASOCIADOS CON LA DMAE NEOVASCULAR EN PACIENTES DE LA COMUNIDAD DE MADRID

Actualmente está bien establecido que los factores genéticos contribuyen de manera fundamental al desarrollo de los distintos tipos de DMAE. Dos genes cuya estrecha asociación con la patología se ha demostrado consistentemente en poblaciones caucásicas son el *CFH* y el *LOC387715/ARMS2* que codifican, respectivamente, el factor H del complemento y una proteína de 12 kDa cuya función aun no se ha determinado. Las publicaciones acerca de los factores genéticos asociados con la DMAE en población española son escasas y en ninguno de los estudios se ha evaluado si dichos factores pueden influenciar la respuesta de los pacientes a la terapia intravítrea con antiangiogénicos. Por ello nuestro objetivo fue, en primer lugar, analizar la asociación de los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* con la DMAE neovascular en población española de la Comunidad de Madrid. Posteriormente se ha valorado la influencia del genotipo respecto a estos dos polimorfismos sobre la respuesta funcional de los pacientes al tratamiento con ranibizumab y los cambios de la morfología macular inducidos por el agente antiangiogénico.

5.3.1.- COMPARACIÓN DE NUESTRO ESTUDIO CON OTROS REALIZADOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

Todos los participantes en nuestro estudio (E2) eran españoles residentes en la Comunidad de Madrid. El grupo DMAE estaba constituido por 103 pacientes diagnosticados de DMAE neovascular que llevaban a cabo su seguimiento en la Unidad de Mácula del Servicio. Los controles fueron 117 sujetos seleccionados entre aquellos que se sometieron a cirugía de cataratas en el Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos, a los que se realizaron pruebas diagnósticas para excluir a los que pudieran presentar alteraciones maculares. La edad media de los grupos control y DMAE fue $78,3 \pm 7,2$ y $80,3 \pm 7,05$, respectivamente, y la proporción de sexos fue similar en los dos casos (43% y 40% de varones).

Los resultados obtenidos tras realizar el genotipado de las muestras y el análisis estadístico confirman que existe una asociación significativa entre la DMAE neovascular y los polimorfismos rs1061170 (Y402H) del gen *CFH* y rs10490924 (A69S) del gen

LOC387715/ARMS2 en la población de la Comunidad de Madrid. En la Tabla 5.2 se pueden comparar nuestros resultados con los obtenidos para otras poblaciones españolas de distintas localizaciones geográficas.

Tabla 5.2.- Resultados de los estudios de asociación de los polimorfismos rs1061170 (Y402H, CFH) y rs10490924 (A69S, LOC387715/ARMS2) con la DMAE exudativa en población española.

Estudios con población española	CFH SNP Y402H			LOC387715/ARMS2 SNP A69S						
	ALELO C		GENOTIPO CC		ALELO T		GENOTIPO TT			
	Frecuencia Control	DMAE	% Control	DMAE	OR (CC vs TT)	Frecuencia Control	DMAE	% Control	DMAE	OR (TT vs GG)
De la Fuente <i>et al.</i> ²⁷⁵ Nº pacientes: 140	0,33	0,51	15	36	2,4	ND	ND	ND	ND	ND
Recalde <i>et al.</i> ²⁷⁶ Nº pacientes:120	0,28	0,47	6	25	7,7	0,21	0,49	5	25	11,8
García Layana <i>et al.</i> ²⁷⁷ Nº pacientes: 97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Brion <i>et al.</i> ²⁷⁸ Nº pacientes: 57	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	12,64
Cruz-González <i>et al.</i> ²⁷⁹ Nº pacientes: 74	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	3,3	17,8	-
ESTUDIO 2 Nº pacientes: 103	0,308	0,519	8,5	25,2	6,5	0,154	0,426	1,7	19,6	23,7

Se indican la frecuencia de los correspondientes alelos de riesgo, C o T, para los polimorfismos Y402H y A69S, respectivamente, y los porcentajes de los genotipos de riesgo (CC o TT) en los controles y los pacientes con DMAE exudativa. OR, *odds ratio*. ND, no determinado. (-) Datos no presentados en la publicación.

Respecto al polimorfismo Y402H, la frecuencia del alelo de riesgo C en el grupo control (0,308) fue similar a la descrita para los europeos (0,3)¹²⁵, siendo significativamente mayor en los pacientes con DMAE neovascular que en los controles. La distribución de genotipos en los dos grupos presentó también claras diferencias como se observa en la Figura 5.1. En

comparación con el grupo control, en el grupo DMAE aumenta el porcentaje de sujetos que presentan una o dos copias del alelo de riesgo, aumento que se debe fundamentalmente al incremento del porcentaje de homocigotos CC. Este porcentaje alcanza el 25,2% mientras que en el grupo control es sólo un 8,5%. En homocigosis, el alelo C incrementa el riesgo para DMAE 6,5 veces, valor del mismo orden que el hallado por Recalde *et al.* (OR = 7,7)²⁷⁶ pero superior al descrito por De la Fuente *et al.* (OR = 2,4)²⁷⁵. Probablemente, la razón de esta diferencia es que en la muestra control del último estudio hay un mayor porcentaje de sujetos que presenta el genotipo de riesgo CC.

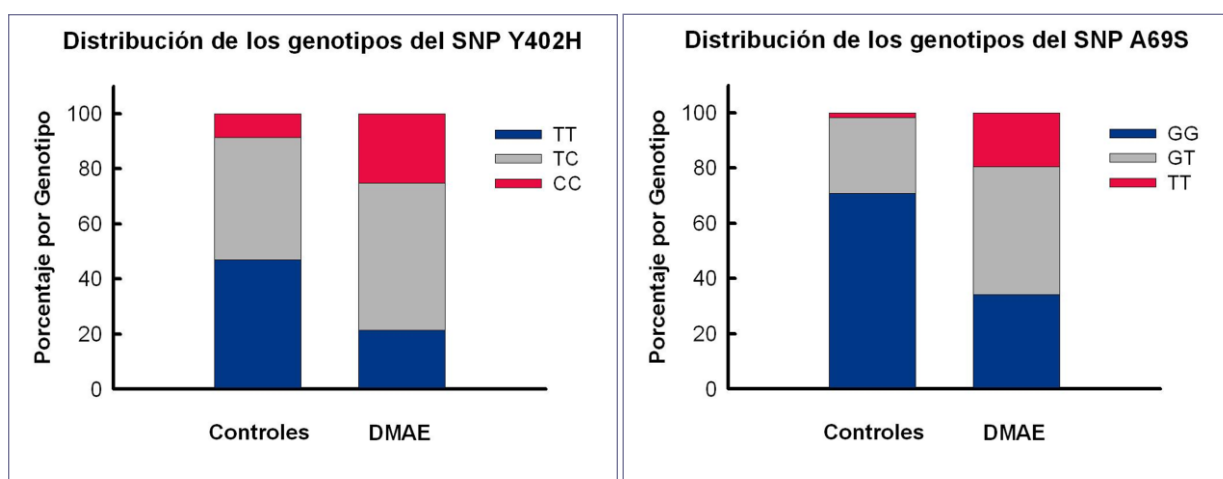


Figura 5.1.- Distribución de los genotipos para los polimorfismos Y402H de *CFH* y A69S de *LOC387715/ARMS2* en población española de la Comunidad de Madrid entre controles sanos y pacientes con DMAE neovascular.

En cuanto al polimorfismo A69S, la frecuencia del alelo de riesgo T fue también mayor en los pacientes que en los controles (0,426 vs 0,154; $p < 0.001$) (Tabla 5.2). La Figura 5.1 muestra la distribución de genotipos en ambos grupos. En los controles se observa el predominio del *wild type* GG (70,9%), mientras que el genotipo de riesgo TT está escasamente representado (1,7%). Sin embargo, en los pacientes disminuye drásticamente el genotipo GG (34,3%) y aumenta el TT (19,6%). La variante 69S incrementa la probabilidad de que el sujeto homocigoto padezca DMAE neovascular por un factor de 23,71, lo que indica que este polimorfismo confiere más riesgo para la patología que el Y402H. Este resultado es consistente con el hallado previamente^{276, 277}, aunque en nuestro caso el valor de OR es notablemente superior (23,7 vs 11,8 y 9). Hay que señalar que en nuestro grupo de controles, el porcentaje

del genotipo de riesgo TT es extremadamente bajo, lo que consecuentemente se refleja en una OR alta. Posiblemente un factor que puede haber contribuido a este resultado es que los sujetos que formaron el grupo control eran de edad avanzada y en todos los casos, se comprobó la ausencia de alteraciones maculares mediante funduscopy y OCT, técnica que como se ha mencionado es capaz de detectar sutiles variaciones morfológicas. En consecuencia, la probabilidad de que pudieran desarrollar en el futuro una DMAE neovascular es mínima y en este sentido se pueden considerar como un auténtico “grupo control”. Sin embargo, en una muestra de población general, a la que se aplicase además un procedimiento de valoración del estado macular menos riguroso, cabría esperar más heterogeneidad en su estado y evolución futura, de manera que la distribución genotípica podría ser menos favorable, modificándose a la baja el valor de OR. Otro factor a considerar es que en nuestro estudio, un 20% de los pacientes presentaban proliferación angiomasosa retiniana (RAP) y recientemente se ha descrito²⁸⁰ que la asociación del SNP A69S con la RAP es mucho más fuerte que con los otros subtipos de DMAE neovascular: ORs del genotipo TT vs GG fueron 22,18 para RAP, 7,03 para DMAE neovascular típica, y 3,37 para vasculopatía coroidea polipoidea. En los estudios con población española antes mencionados no se describe la edad y el modo de selección de los controles “sanos”, ni los tipos de DMAE neovascular que presentaban los pacientes por lo que se dificulta la comparación directa de resultados.

5.3.2.- POLIMORFISMOS Y402H Y A69S EN POBLACIÓN ESPAÑOLA, EUROPEA Y OTROS GRUPOS ÉTNICOS

En conjunto, estos resultados indican que la población española sigue el patrón de otras poblaciones caucásicas en cuanto a la asociación de los polimorfismos Y402H y A69S con la DMAE exudativa. En los estudios iniciales con poblaciones caucásicas de diversas procedencias geográficas se estimó que la variante alélica C del polimorfismo Y402H incrementaba el riesgo para DMAE por un factor de 2,1 a 4,6 en individuos heterocigotos y por un factor de 3,3 a 7,4 en los homocigotos, resultados que fueron confirmados en 2006 a través de un meta-análisis que incluyó 4856 casos procedentes de 8 estudios. Este meta-análisis determinó ORs de 2,50 y 6,32 para los portadores de una o dos copias del alelo C, respectivamente¹²⁶. Como el número de investigaciones al respecto ha aumentado extraordinariamente en los últimos años, se han publicado en 2012 los resultados de un nuevo

meta-análisis que ha analizado un conjunto de 40 estudios con poblaciones europeas (ninguna española), asiáticas, latinoamericanas y sudafricanas negras¹²⁵. Los 24 estudios correspondientes a europeos han incluido un total de 26494 individuos y 14174 casos de DMAE. En esta población, la OR estimada por alelo de riesgo para la DMAE avanzada es de 2,27, un valor algo inferior al descrito previamente. Es interesante mencionar que la asociación es similar para la atrofia geográfica y la neovascularización coroidea (ORs de 2,50 y 2,28 por alelo de riesgo, respectivamente), menor para la DMAE temprana (OR = 1,47) y no se modifica por el tabaquismo. Sin embargo, la etnicidad parece tener un efecto ya que en los estudios realizados con poblaciones orientales (principalmente chinos, japoneses y coreanos) no se ha hallado consistentemente una asociación de este polimorfismo con la DMAE. Dado que la información es todavía limitada y que la frecuencia del alelo de riesgo en estas poblaciones es muy baja, los autores del meta-análisis concluyen que son necesarios estudios con mayor potencia estadística para descartar la ausencia de efectos de esta variante en orientales.

En cuanto al polimorfismo A69S, la variante 69S confiere un importante aumento del riesgo para la DMAE neovascular en la población española tanto en homocigosis como en heterocigosis. De hecho, la asociación de este polimorfismo con la patología parece más fuerte que la del Y402H. Los estudios realizados hasta la fecha han confirmado la asociación de A69S con la DMAE tanto en poblaciones caucásicas como orientales y mediante un meta-análisis se ha estimado que los homocigotos TT y los heterocigotos TG tienen un factor de riesgo para DMAE 7.5 y 2.4 veces mayor, respectivamente, que los homocigotos GG¹³⁹. A la vista de estos valores, parece que el genotipo TT puede conferir un riesgo mayor para la población española teniendo en cuenta las ORs calculadas en los estudios que se recogen en la Tabla 5.2. Así como el polimorfismo Y402H está igualmente asociado con las dos formas de DMAE avanzada, en el caso de A69S se ha demostrado que el alelo de riesgo predispone al desarrollo de DMAE exudativa (OR entre 1,34-1,56 para DMAE neovascular frente a atrofia geográfica)^{150, 281} y dentro de la neovascularización típica, preferentemente al fenotipo de NVC clásica y con lesiones fibrovasculares²⁸². El SNP A69S confiere riesgo para la DMAE de forma independiente al Y402H, lo que sugiere que las variantes de riesgo deben actuar a través de mecanismos diferentes.

El polimorfismo T1277C del gen *CFH* conduce a la sustitución de un residuo de tirosina por uno de histidina en la posición 402 de la cadena polipeptídica del factor H del complemento. Este cambio tiene consecuencias funcionales importantes: se altera la especificidad de la unión del factor H a diferentes glicosaminoglicanos, y se reduce su unión a las células del EPR y a la membrana de Bruch. Aunque la relevancia fisiológica de estas observaciones no está totalmente aclarada, la hipótesis más aceptada es que estos cambios provocan una regulación deficiente de la ruta alternativa del complemento con el consiguiente daño a las células propias^{24, 31, 154-156, 158, 159, 161, 162, 213}. La identificación de otros SNPs asociados a la DMAE en los genes *CFB*, *C3* y *CFHR1* relacionados con el complemento^{130, 152} refuerza la idea de que una regulación defectuosa de este sistema juega un papel fundamental en la patogénesis de la DMAE. Por otra parte, el SNP G270T del gen *LOC387715/ARMS2* conduce a la sustitución de un residuo de alanina por uno de serina en la posición 69 de la proteína producto. La función fisiológica de *ARMS2* no se ha establecido definitivamente aunque se han propuesto diversas posibilidades: participación en la homeostasis mitocondrial en los fotorreceptores^{141, 145}, en la digestión de los segmentos externos de los fotorreceptores por el EPR¹⁷¹, en la protección contra la formación de drusas en la membrana de Bruch¹⁵³, o bien desempeñar una función de soporte de los fotorreceptores y/o el EPR¹⁴³. Por tanto, el mecanismo a través del cual se asocia este polimorfismo con la DMAE es todavía desconocido.

5.3.3.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y RELEVANCIA PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA

Una limitación de este estudio es que el número de pacientes dificulta la estratificación de la DMAE exudativa entre la neovascularización típica y sus subtipos (clásicas y ocultas), la vasculopatía coroidea polipoidea y la proliferación angiomasosa retiniana, para analizar cual es la asociación de las variantes de riesgo de los dos polimorfismos con los distintos fenotipos en la población española. Por otra parte, dada la baja frecuencia del alelo de riesgo del polimorfismo A69S en el grupo control, no se han encontrado en este grupo sujetos dobles homocigotos para los genotipos de riesgo de los dos SNPs analizados y no ha sido posible calcular con fiabilidad cómo se incrementa el riesgo para la DMAE en esta circunstancia. Sería muy interesante realizar estudios multicéntricos que abarcasen un elevado número de sujetos

para aumentar la potencia estadística, incluyendo además muestras representativas de la población general como grupo control.

En todo caso, está claro que los dos polimorfismos analizados en este estudio presentan una fuerte asociación con la DMAE en población española, al igual que en distintas poblaciones caucásicas. A diferencia de otros trastornos comunes, en los cuales muchos genes confieren susceptibilidad para la patología pero con efectos pequeños, las variantes de riesgo para la DMAE son comunes en la población y sus efectos son muy importantes. De hecho, hasta la fecha se han realizado unos 4500 estudios de asociación del genoma completo (GWAS) en relación con patologías comunes en sujetos de ancestros europeos y se ha comprobado que la asociación de los alelos de riesgo de *CFH* y *LOC387715/ARMS2* con la DMAE es de las más fuertes para alelos comunes que confieren susceptibilidad para un trastorno complejo ¹²⁵. Por ello hay un interés creciente en utilizar estos polimorfismos para identificar precozmente a los individuos con alto riesgo de padecer DMAE. Esta información podría ser útil para anticipar el diagnóstico clínico de una patología difícil de tratar, intentar programas de prevención y alertar a las personas asintomáticas.

Aunque los polimorfismos Y402H y A69S presentan una estrecha asociación con la DMAE, hay que recordar que existen otros polimorfismos de los genes *CFH* y *LOC387715/ARMS2*, así como otros genes involucrados en la patología, cuyos efectos, aunque de menor entidad, pueden aumentar o disminuir el riesgo para DMAE. Por ello, un test basado solamente en estos dos marcadores genéticos tendría probablemente un valor predictivo limitado. Se ha sugerido que este parámetro podría aumentar si se combinaran los marcadores genéticos con otro tipo de biomarcadores. Por ejemplo, los niveles de carboxietilpirrol, un producto de la modificación oxidativa de proteínas están elevados en la membrana de Bruch, drusas y plasma de pacientes con DMAE atrófica y exudativa, y se ha descrito que la determinación de los niveles plasmáticos de este marcador oxidativo, en combinación con marcadores genéticos (Y402H de *CFH*, A69S de *LOC387715/ARMS2*, R102G de *C3* y rs11200638 en la región del promotor de *HTRA1*) permite discriminar entre pacientes con DMAE y sujetos control con una seguridad del 80% ²⁸³.

Actualmente se dispone en España de un test desarrollado por investigadores españoles, y comercializado por *Secugen* que estudia siete marcadores de los genes *CFH*, *LOC387715/ARMS2*, *CFB* y *C3*, incluyendo los polimorfismos Y402H y A69S. En función de los resultados, y mediante un algoritmo, se puede asignar al paciente a uno de los cuatro grupos de riesgo que estandariza el análisis (muy bajo, bajo, moderado o alto). Habrá que comprobar si la realización del test supone beneficios reales, ya que el valor predictivo del test no es del 100% y además, se sabe que aunque la predisposición genética a padecer DMAE es importante, los factores ambientales también contribuyen notablemente. Por otra parte, su validez para residentes en España con ancestros de otros grupos étnicos sería cuestionable. El oftalmólogo deberá valorar cuidadosamente en cada caso la utilidad y conveniencia del consejo genético.

En conclusión, los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* están estrechamente asociados con la DMAE neovascular en pacientes españoles de la Comunidad de Madrid. Una o dos copias del alelo de riesgo C (polimorfismo Y402H) incrementan 2,64 y 6,50 veces, respectivamente, la posibilidad de padecer la patología. La asociación es más fuerte para el polimorfismo A69S, ya que este riesgo aumenta 3,48 y 23,71 veces. La identificación de estos polimorfismos como factores de riesgo para la DMAE neovascular en poblaciones españolas de distinta localización geográfica puede ser importante para su utilización como marcadores genéticos.

5.4.- EFICACIA DE LA TERAPIA CON RANIBIZUMAB EN RÉGIMEN *PRN* E INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS Y402H Y A69S SOBRE LA RESPUESTA A UNO, DOS Y TRES AÑOS DE SEGUIMIENTO

5.4.1.- RESPUESTA FUNCIONAL

Hasta el momento, el tratamiento que se ha mostrado más eficaz para la DMAE exudativa es el ranibizumab intravítreo (*Lucentis*[®], *Novartis*). Se trata de un fragmento de un anticuerpo monoclonal recombinante, diseñado específicamente para uso intraocular, que inhibe con alta afinidad a todas las isoformas del VEGF-A²⁰⁶. En los ensayos clínicos pivotaes en los que se determinó la eficacia de la terapia antiangiogénica con ranibizumab, se utilizó una pauta fija de inyecciones mensuales^{68, 224, 225}. Sin embargo, la aplicación de este protocolo no es viable en la práctica clínica habitual por los costes económicos que conlleva y los riesgos asociados, tanto al fármaco, como a su vía de administración. Además, es importante recordar que el tratamiento se prolonga durante años en la mayor parte de los casos, por lo que esta pauta posológica no resulta operativa ni para los pacientes y sus familias, ni para los especialistas. Los esfuerzos actuales van dirigidos a encontrar protocolos de tratamiento más eficientes que permitan mantener buenos resultados anatómicos y funcionales, con un menor número de inyecciones y, en consecuencia, con un menor riesgo de efectos secundarios. De este modo se han propuesto otra pautas que, con mayor o menor eficacia, pretenden mantener los buenos resultados de este tratamiento en la prevención de la pérdida severa de agudeza visual asociada a la DMAE exudativa^{226-229, 234, 236, 284} y las sociedades oftalmológicas desarrollan guías clínicas actualizadas que favorezcan la aplicación de la evidencia científica disponible en la práctica habitual.

En esta Memoria se presentan los resultados obtenidos en la práctica clínica real con el protocolo aplicado en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, Centro de referencia de la Comunidad de Madrid para la DMAE neovascular. Dicho protocolo es el aprobado por la Sociedad Española de Retina y Vítreo, y consiste en 3 inyecciones mensuales (fase de carga), seguidas de retratamiento a demanda según criterios angiográficos (actividad de la lesión), tomográficos (aumento en CRT de al menos 100 micras, presencia de hemorragia macular, presencia de NVC clásica nueva en AFG, persistencia de fluido 1 mes post-tratamiento,

aparición de líquido subretiniano, presencia de quistes intrarretinianos, y crecimiento de DEP) y funcionales (pérdida de agudeza visual de 5 o más letras ETDRS con evidencia de fluido en la mácula). Estos criterios de retratamiento son los empleados en la ampliación efectuada durante el segundo año del estudio PrONTO²²⁹. En la Tabla 5.3 se comparan los resultados más relevantes obtenidos en el estudio E3 de esta investigación con los de otros estudios de referencia.

En términos de agudeza visual, los resultados en nuestra serie son muy satisfactorios. Tras la fase de carga, el 98% de los pacientes perdió menos de 15 letras ETDRS y un 27,2% ganó 15 o más letras. Estos porcentajes se mantuvieron al año (96,1% y 29,1%, respectivamente) y descendieron ligeramente a los dos años de seguimiento (94,4% y 23,3%, respectivamente). La mejoría de agudeza visual fue +8,1 letras ETDRS tras las tres primeras inyecciones, +7,7 al finalizar el año de seguimiento y +6,7 a los dos años. Estos valores son similares a los obtenidos en el ensayo clínico conocido por el acrónimo MARINA⁶⁸ (+7,2 y +6,6) e inferiores a los descritos en el ANCHOR^{224, 225} (+11,3 y +10,7). En estos dos grandes ensayos se utilizó un mismo protocolo de administración mensual de ranibizumab. Sin embargo, el tipo de lesión que presentaban los pacientes incluidos en cada estudio era distinto: ocultas o mínimamente clásicas en el MARINA y predominantemente clásicas sin componente oculto en el ANCHOR. El tipo mayoritario de lesión de nuestros pacientes era la oculta (56,3%), y los tipos clásicos suponían sólo el 16,5% de la muestra, por lo que es razonable que el resultado obtenido se asemeje más al del MARINA. En nuestro caso, la ganancia de agudeza visual se consiguió con un promedio de 5,3 inyecciones al año, incluyendo las tres de carga (8,9 en los dos años), lo que confirma que la administración de ranibizumab según el régimen *pro re nata* tras la dosis de carga puede ser tan eficaz como el protocolo de inyecciones mensuales para mejorar, en general, la visión de los pacientes con DMAE neovascular. Además, el análisis estadístico muestra que el número de inyecciones que reciben los pacientes durante el período de seguimiento no está relacionado con la agudeza visual al final del mismo.

En la Tabla 5.3 también se recogen los resultados obtenidos en otros importantes estudios en los que se ha aplicado el régimen PRN tras las tres inyecciones de carga. Nuestros resultados a uno y dos años en términos de mejoría de agudeza visual son inferiores a los del ensayo PrONTO^{228,229} pero se comparan favorablemente con los de los restantes estudios.

Tabla 5.3.- Respuesta funcional de pacientes con DMAE neovascular al tratamiento con ranibizumab intravítreo en distintos ensayos clínicos y comparación con los resultados del estudio E3 de la presente investigación.

ESTUDIO <i>Nº pacientes</i> <i>Duración</i> <i>Tipo de lesión</i>	Ganancia media <i>Letras ETDRS</i>			Ganan ≥ 15 letras <i>% pacientes</i>			Pierden <15 letras <i>% pacientes</i>			Nº total de inyecciones	
	Carga	1 año	2 años	Carga	1 año	2 años	Carga	1 año	2 años	1 año	2 años
MARINA*, 2006 ⁶⁸ <i>N = 240</i> <i>2 años</i> <i>Oculto, Min. clásica</i>	-	7,2	6,6	-	33,8	33,3	-	94,6	90,0	12	24
ANCHOR*, 2006, 2009 ^{224,225} <i>N = 140</i> <i>2 años</i> <i>Pred. clásica</i>	-	11,3	10,7	-	40,3	41,0	-	96,4	90,0	12	24
PrONTO [¶] , 2007, 2009 ^{228,229} <i>N = 40/37</i> <i>1 y 2 años</i> <i>Todos los tipos</i>	10,8	9,3	11,1	32,5	35,0	43,0	97,5	95,0	97,5	5,6	9,9
SAILOR [¶] , 2009 ²³¹ <i>N = 490</i> <i>1 año</i> <i>Oculto, Pred. clásica</i> <i>Min. Clásica,</i>	7,0	2,3	-	20,1	19,3	-	N.D	N.D.	-	4,9	-
CATT [¶] , 2011, 2012 ^{209, 210} <i>N = 298/264</i> <i>1 y 2 años</i> <i>Oculto, Pred. clásica</i> <i>Min. Clásica, RAP</i>	5,6	6,8	6,7	17,0	24,9	30,7	97,0	95,4	92,8	6,9	12,6
SUSTAIN [¶] , 2011 ²³³ <i>N = 455</i> <i>1 año</i> <i>Oculto, Clásica,</i> <i>Min.Clásica</i>	5,8	3,6	-	19,3	19,3	-	96,7	92,5	-	5,6	-
ESTUDIO 3 [¶] <i>N = 103/ 90</i> <i>1 y 2 años</i> <i>Todos los tipos</i> <i>N = 54</i> <i>3 años</i> <i>Todos los tipos</i>	8,1	7,7	6,7	27,2	29,1	23,3	98,0	96,1	94,4	5,3	8,9
	9,3	8,7	6,7	29,6	29,6	20,4	100	96,3	96,3	4,8	8,1
		3 años: 4,1			3 años: 25,9			3 años: 90,7		3 años:14,2	

DISCUSIÓN

Protocolo aplicado en los distintos estudios para la administración de Ranibizumab (0.5 mg/inyección):

*: inyecciones mensuales

¶: 3 inyecciones mensuales y retratamientos a demanda (PRN)

N.D.: No indicado en el artículo.

Distintos factores pueden contribuir a explicar estas diferencias. En primer lugar, la agudeza visual de los pacientes al diagnóstico va a influir sobre la mejoría conseguida tras el tratamiento con ranibizumab, de forma que los sujetos con buena agudeza visual tienen menos probabilidad de ganancia de visión que aquellos que parten de una pobre agudeza visual (véase la Figura 4.12). En este sentido, los pacientes seleccionados en el estudio PrONTO ^{228,229} presentaban al inicio una agudeza visual en el intervalo 20-70 letras ETDRS, mientras que en nuestra serie, un 25% de los pacientes partían de un valor basal mayor de 70 letras ETDRS. Esto puede justificar por qué la ganancia media en letras ETDRS fue mayor en el PrONTO que en nuestro estudio aunque en ambos casos se siguió el mismo protocolo. En cuanto a los ensayos SAILOR ²³¹ y SUSTAIN ²³³, la mejoría visual conseguida al año (+2,3 y +3,6 letras, respectivamente) fue menor que en nuestra serie a pesar de que el porcentaje de pacientes con buena agudeza visual al inicio era muy bajo (i. e., 3,3% con visión \geq 74 letras ETDRS en el SUSTAIN). Hay que señalar que los datos de SAILOR y SUSTAIN se refieren a pacientes que no habían recibido ningún tipo de tratamiento previo, al igual que los de nuestra serie. Probablemente, estos resultados menos satisfactorios se deben a que los criterios de retratamiento seguidos en ambos ensayos clínicos fueron el aumento del CRT de más de 100 micras o la pérdida de agudeza visual de 5 o más letras ETDRS, mientras que en nuestro caso se siguieron además criterios adicionales. De particular interés es que los cambios cualitativos observados con la OCT de dominio espectral permiten detectar precozmente las recurrencias posibilitando el retratamiento antes de que una gran cantidad de fluido se reaccumule en la mácula (100 micras de aumento del CRT), o se produzca la pérdida de visión. Por otra parte, ya se ha mencionado que aumentos de más de ~30 micras del CRT en las imágenes obtenidas con la SD-OCT son clínicamente significativos (véase sección 5.1), por lo que creemos que sería conveniente revisar este criterio de retratamiento y modificar a la baja la magnitud del cambio que se requiere para la reinyección.

Respecto al estudio CATT ^{209,210}, los resultados referidos al grupo de pacientes “naïve” tratados con 0.5 mg de ranibizumab a demanda son muy semejantes a los de nuestra serie. También aquí se consideró como uno de los signos de neovascularización activa la presencia de fluido detectada mediante OCT de dominio temporal (la SDS-OCT se introdujo para el seguimiento de un 22,6% de los pacientes durante el segundo año). A la vista de nuestros datos y los resultados de los ensayos citados en los que se ha empleado el régimen PRN,

parece clara la conveniencia de incluir como criterio de retratamiento la aparición de cualquier cambio cualitativo en las imágenes de OCT que sugieran presencia de fluido en la mácula.

Una cuestión importante es saber si el tratamiento con ranibizumab a demanda es eficaz para mantener a largo plazo la mejoría de agudeza visual conseguida tras la dosis de carga. Como se indica en la Tabla 5.3, el tiempo de seguimiento del estudio CATT ha sido de dos años, y sólo de uno en SAILOR, y SUSTAIN al igual que en otros publicados en los que se ha aplicado el régimen PRN ^{285, 237, 286}. En esta investigación hemos analizado y se describe por primera vez la respuesta al tratamiento con ranibizumab durante tres años. La Figura 5.2 muestra la evolución de la agudeza visual a lo largo de este período del subgrupo de 54 pacientes de la muestra inicial.

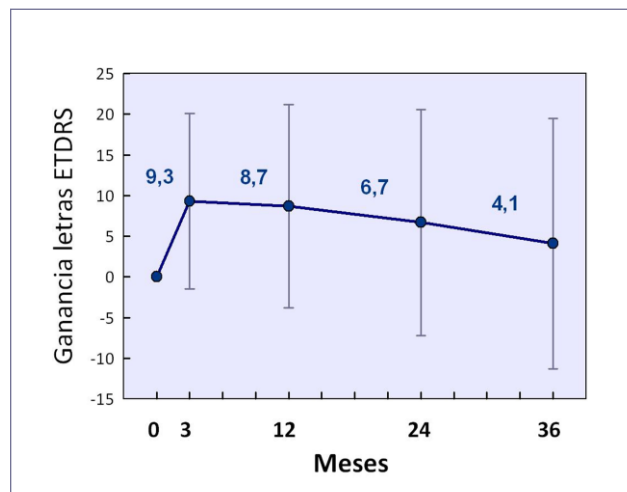


Figura 5.2.- Evolución de la agudeza visual a lo largo de tres años de tratamiento con ranibizumab. Se representan medias \pm DS. El protocolo seguido incluyó dosis de carga seguida de retratamiento a demanda según criterios angiográficos, tomográficos y funcionales.

Después de las tres inyecciones obligatorias, la ganancia media en letras ETDRS fue de +9,3. Se mantuvo prácticamente sin cambios a lo largo del primer año para descender progresivamente a lo largo del segundo y tercer año, de forma que al final del período de seguimiento la mejoría visual media era sólo un 44% de la conseguida tras la dosis de carga (+4,1 letras, $p = 0,04$). La tendencia observada sugiere que la capacidad del agente antiangiogénico para mantener la visión puede disminuir a largo plazo, al menos en un número de pacientes. De hecho, como indica la Tabla 5.3, un 4% de nuestros pacientes perdieron 15 o más letras al año, pero este porcentaje aumentó hasta el 10% al finalizar los tres años. En los estudios MARINA y ANCHOR también se ha observado que un 10% de los

pacientes sufrían una pérdida semejante de visión tras dos años de tratamiento con inyecciones mensuales de ranibizumab a pesar de que el fármaco suprimió efectivamente la lesión neovascular²⁸⁷. La causa del descenso de agudeza visual no se pudo determinar aunque parecía estar relacionado con anomalías del EPR visualizadas mediante retinografía. Al no disponer de imágenes de OCT de los pacientes afectados, no fue posible analizar la evolución del estado de las estructuras retinianas y su potencial relación con la pérdida de visión. En nuestro caso, las imágenes de OCT de tres de los cinco pacientes que perdieron más de 15 letras a los tres años de seguimiento revelaban que la pérdida de visión podía atribuirse a la presencia de fibrosis secundaria a la neovascularización (Figura 5.3). En los otros dos casos, no se detectó presencia de fluido intrarretiniano, hemorragia o fibrosis que pudieran justificar la pérdida de función visual aunque se apreciaba atrofia macular con alteraciones del EPR y pérdida de fotorreceptores. Todos estos pacientes recibieron un total de 11-13 inyecciones a lo largo del período de seguimiento. Curiosamente, también en el estudio CATT se ha observado que un número de pacientes presentaban atrofia geográfica tras dos años de terapia con ranibizumab, siendo mayor el porcentaje en el grupo que recibió tratamiento mensual (25,8%) que en el que siguió un régimen a demanda (15,2%)²¹⁰.

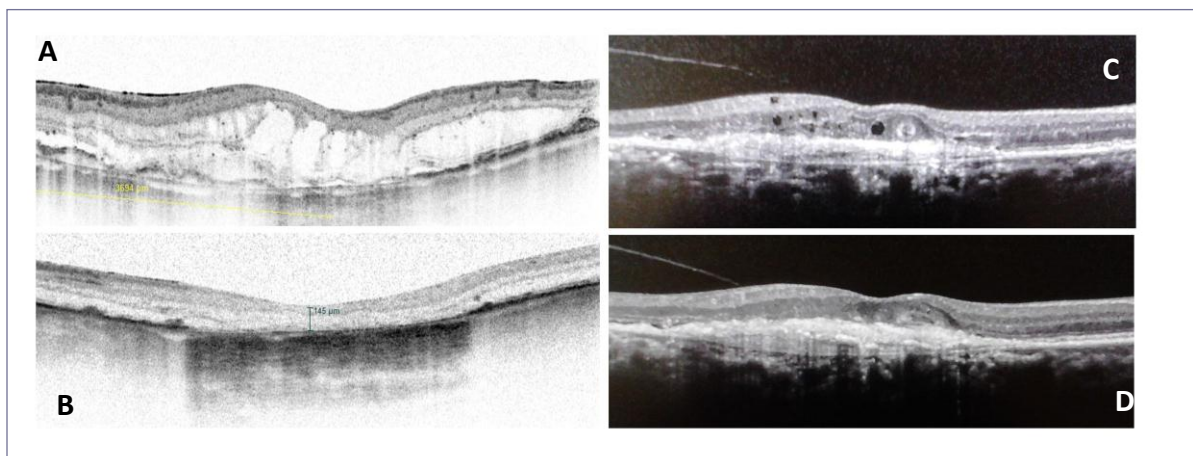


Figura 5.3.- Pérdida de visión de 15 o más letras ETDRS a los 36 meses tras tratamiento con ranibizumab. Izquierda: Imágenes de OCT de uno de los pacientes al diagnóstico (A) y a los 36 meses (B). Antes de iniciar el tratamiento, se observa presencia de fluido intra y subretiniano; a los 36 meses, se ha resuelto el edema macular pero la imagen de OCT muestra alteraciones en el EPR, pérdida de fotorreceptores y atrofia de la retina. Derecha: Paciente que presentaba quistes intrarretinianos al inicio (C) con evidencia de extensa fibrosis a los 36 meses (D).

Una posibilidad a considerar es que la pérdida de visión a largo plazo sea debida a un efecto neurotóxico causado por las inyecciones repetidas del agente antiangiogénico. El VEGF

producido en la retina adulta por el EPR juega un papel esencial en el mantenimiento de las fenestraciones de la coriocapilar y actúa además en forma autocrina para preservar la integridad y función del EPR²⁸⁸⁻²⁹⁰. También las células de Müller secretan VEGF con función autocrina, para asegurar la propia supervivencia, y paracrina, actuando como un potente factor neurotrófico sobre los fotorreceptores y las células ganglionares²⁹¹. Por tanto, la inhibición crónica del VEGF por ranibizumab podría eliminar esta neuroprotección y provocar a largo plazo degeneración de las células nerviosas. En algunas investigaciones con modelos animales y en ensayos *in vitro* con líneas celulares, se ha observado que el bloqueo del VEGF con agentes antiangiogénicos provoca alteraciones estructurales y funcionales del EPR^{289, 292}, atrofia de la coriocapilar²⁸⁸ y apoptosis de células de las capas nucleares interna y externa²⁹¹, aunque en otros estudios no se han detectado efectos citotóxicos sobre diferentes tipos de células oculares^{293, 294}. Hasta la fecha se admite que ranibizumab no provoca efectos adversos sobre la retina en humanos pero recientemente se han publicado los resultados de un estudio prospectivo llevado a cabo en nuestro Servicio que demuestran que el tratamiento de pacientes afectados por DMAE neovascular con *Lucentis*® intravítreo durante doce meses causa una disminución significativa (5,2%, $p < 0,001$) del grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina que no se puede justificar por la formación de edema macular en la región peripapilar o elevación de la presión intraocular²⁹⁵. El empleo de la OCT de dominio espectral ha permitido detectar este pequeño cambio que sugiere que la administración crónica de ranibizumab podría tener un efecto neurotóxico sobre las células ganglionares cuyos axones constituyen la capa de fibras nerviosas.

En todo caso hay que considerar que la vida media de ranibizumab en el vítreo y el humor acuoso se ha estimado en 3,2²⁹⁶ y 7,19 días²⁹⁷, respectivamente. Por ello, cabe pensar que la posible supresión del efecto neuroprotector del VEGF no sería total dado que en el tiempo transcurrido entre sucesivos retratamientos podría aumentar el nivel de VEGF activo. Por otra parte, no todos los pacientes perdieron progresivamente visión a lo largo de los 3 años de seguimiento y de hecho, un 25% mantuvo una ganancia de 15 o más letras ETDRS. Es posible que el balance entre los efectos antiangiogénicos de la terapia con ranibizumab y sus potenciales efectos neurodegenerativos sea positivo para una parte de los pacientes, mientras que podría resultar desfavorable para cierto número de sujetos que perderían gradualmente visión por ser especialmente susceptibles a la inhibición del VEGF. Todo lo anterior pone de

manifiesto la necesidad de realizar estudios a gran escala en los que se evalúe la eficacia y seguridad del tratamiento con antiangiogénicos a largo plazo, y la conveniencia de introducir innovaciones en la terapia anti-VEGF orientadas a lograr la protección del EPR y las células nerviosas con el fin de conseguir la mejoría de la visión en un mayor número de pacientes.

5.4.2.- NECESIDAD DE RETRATAMIENTOS

Otra cuestión interesante se refiere al número total de inyecciones que requirieron los pacientes a lo largo del seguimiento. El valor medio a uno y dos años (5,3 y 8,9, respectivamente) es del mismo orden o ligeramente inferior al descrito en los estudios que siguieron el régimen PRN (véase Tabla 5.3). Sin embargo es llamativa la variabilidad en cuanto al número de retratamientos requeridos por cada paciente. Así, un 20,4% recibió únicamente la dosis de carga durante el primer año y un 10-11% seguían sin retratamiento a 2 y 3 años, mientras que otros pacientes precisaron un número elevado de inyecciones. Por otra parte, las recurrencias tras la resolución inicial de las manifestaciones de la NVC con la terapia anti-VEGF no se presentaban a intervalos regulares, y su frecuencia aumentaba con el tiempo de seguimiento tras la dosis de carga.

Estas acusadas diferencias individuales respecto al número de retratamientos también se han observado en otros estudios^{226, 229, 284, 298} pero la causa todavía es desconocida. Hemos intentado averiguar qué factores podrían tener influencia sobre esta variable. No se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el tipo de lesión o la edad al diagnóstico y el número de inyecciones. Tampoco existe correlación con la mayor o menor ganancia de visión como ya se ha comentado. Puesto que, la dosis de carga de ranibizumab fue eficaz en una mayoría de casos para resolver el edema macular, es lógico pensar que la necesidad de retratamiento esté causada por la reactivación de los procesos que conducen a la neovascularización o a sus manifestaciones. Sin embargo, este fenómeno sólo parece ocurrir en un número de pacientes y no en aquellos otros que requirieron únicamente la dosis de carga. Esto sugiere que los eventos celulares y moleculares que dan lugar al desarrollo de la DMAE neovascular (presente en todos los pacientes al diagnóstico) no son idénticos a los que provocan las recurrencias (ausentes en un número de pacientes, al menos durante el período

de seguimiento realizado). Una posibilidad a considerar es que estas diferencias respondan a la distinta carga genética de los individuos.

5.4.3.- POLIMORFISMOS Y402H Y A69S COMO FACTORES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RANIBIZUMAB

- *Correlación genotipo-fenotipo*

Se ha analizado en primer lugar la posible correlación entre el fenotipo y características clínicas de la DMAE neovascular y los polimorfismos Y402H y A69S. No se ha encontrado correlación estadísticamente significativa entre el genotipo para el polimorfismo Y402H y la edad al diagnóstico de la DMAE neovascular, el tipo de lesión, o la agudeza visual al diagnóstico. Tampoco se ha hallado asociación entre el genotipo para el polimorfismo A69S y las variables analizadas, incluyendo el porcentaje de bilateralidad. Podría esperarse que estos polimorfismos que confieren susceptibilidad para el desarrollo de la DMAE, influyeran sobre las características clínicas dando lugar a una más temprana edad de presentación de la patología, pérdida de visión más acusada, o un aumento de la bilateralidad en los homocigotos para los alelos de riesgo. Aún suponiendo que realmente existiera tal correlación, puede quedar enmascarada por otros factores que incidan sobre estas variables. Por ejemplo, los síntomas iniciales de la DMAE pueden no ser percibidos por el paciente hasta una fase avanzada de la enfermedad, de tal forma que se retrase el diagnóstico a una edad más tardía. También sería posible que en los individuos homocigotos para la variante 402H del gen *CFH*, la alteración funcional del factor H y la consiguiente disfunción de la ruta alternativa del complemento condujeran a una importante inflamación local. En tal caso, la mayor agresividad del proceso podría hacer que el sujeto advirtiera los cambios más tempranamente, de manera que la función visual al diagnóstico no estuviese muy deteriorada. De hecho, en las tres series de este estudio, la agudeza visual al diagnóstico en el grupo homocigoto para el alelo de riesgo del gen *CFH* fue siempre mayor que en los heterocigotos o en los homocigotos *wild type*, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística.

En cuanto al tipo de lesión, no hemos encontrado correlación estadísticamente significativa con ninguno de los polimorfismos analizados aunque la neovascularización oculta era más frecuente en el grupo homocigoto para la variante de riesgo 402H del gen *CFH* que para los heterocigotos y los homocigotos para el alelo Y402 (69%, 54% y 45%, respectivamente, $p = 0,32$). Un estudio previo realizado con 264 pacientes afectados de DMAE exudativa uni o bilateral ha hallado una asociación entre el alelo de riesgo del gen *CFH* con la NVC oculta y entre la variante de riesgo del gen *LOC387715/ARMS2* y la NVC clásica²⁸². Es probable que en nuestro caso, la estratificación de la muestra ($n = 103$) en subgrupos según el tipo de lesión impida alcanzar significación a causa de una insuficiente potencia del análisis estadístico. En todo caso, admitiendo que existiera una correlación entre genotipo y fenotipo de NVC, resulta difícil explicar por qué el alelo de riesgo del gen *CFH* se relacionaría con la forma oculta y la variante de riesgo del gen *LOC387715/ARMS2* con la clásica.

- *Correlación entre el genotipo y la respuesta al tratamiento con ranibizumab*

Más interesante para la práctica clínica es conocer si estos polimorfismos ejercen alguna influencia sobre la respuesta de los pacientes a la terapia con ranibizumab y, en consecuencia, pueden tener valor predictivo. En cuanto al polimorfismo Y402H, los pacientes homocigotos para el alelo de riesgo (CC) presentaron menor ganancia de agudeza visual que los heterocigotos (TC) y los homocigotos *wild type* (TT) tras uno y dos años de seguimiento. Esto sugiere que la presencia de dos copias de la variante 402H se relaciona con una peor respuesta de la función visual, aunque la asociación entre genotipo y respuesta funcional no alcanzó significación estadística. En el estudio a tres años, el análisis ANOVA revela una asociación estadísticamente significativa entre genotipo y evolución de la visión desde el final de la dosis de carga (obligatoria para todos los pacientes) hasta el final del período de seguimiento. Sin embargo, el análisis de regresión lineal múltiple indica que de todas las variables incluidas, la única que se relaciona con los resultados funcionales es la agudeza visual al diagnóstico: una mejor agudeza visual basal se relaciona con una mejor visión después de la terapia con ranibizumab. Por otra parte, tampoco se ha hallado asociación entre el genotipo para este polimorfismo y la necesidad de retratamientos a uno, dos y tres años de seguimiento.

Respecto al polimorfismo A69S, no hay asociación entre genotipo y respuesta funcional. Sin embargo parece influenciar la necesidad de retratamientos a largo plazo, ya que los pacientes homocigotos para alelo de riesgo T recibieron una media de inyecciones de *Lucentis*[®] superior a la de los pacientes con una o dos copias del alelo G. El análisis de regresión lineal múltiple indica que esta relación no es producto de terceras variables (edad del paciente en el momento de diagnóstico de la DMAE exudativa, agudeza visual basal, tipo angiográfico de lesión y polimorfismo Y402H). Es interesante que la diferencia entre genotipos sólo es estadísticamente significativa cuando se consideran tres años de seguimiento o dentro de este período, los dos últimos años. Esto sugiere que la influencia del alelo de riesgo en homocigosis se manifiesta si el tiempo de seguimiento es suficientemente prolongado, lo que parece razonable teniendo en cuenta que el primer año incluye las tres inyecciones de la dosis de carga que son obligatorias para todos los pacientes con independencia de su respuesta individual.

Los estudios sobre este tema están recibiendo una atención creciente puesto que la identificación de marcadores genéticos con valor predictivo permitiría diseñar regímenes individualizados para optimizar la función visual y minimizar el número de inyecciones. En la Tabla 5.4 se recogen los estudios farmacogenéticos realizados hasta la fecha respecto a la influencia de los polimorfismos Y402H y A69S sobre la respuesta al tratamiento con ranibizumab. Como se puede observar los resultados son conflictivos. La razón de estas discrepancias no está clara pero podría estar relacionada con la heterogeneidad de los estudios en cuanto a diseño, tipo de pacientes (sin o con tratamientos previos), pauta de administración de ranibizumab (con protocolos establecidos o a discreción del facultativo), criterios de retratamiento (más o menos estrictos) y tiempo de seguimiento (de 6 meses a 2 años). También hay que considerar que no siempre se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple para verificar que la aparente relación encontrada entre genotipo y mejoría funcional no era debida a efectos de otros factores. Así, McKibbin *et al.*²⁵³ han hallado mediante este análisis que la aparente asociación encontrada entre el genotipo para el polimorfismo Y402 y la ganancia de visión tras la terapia con *Lucentis*[®] no era verdadera y que, al igual que en nuestro estudio, la agudeza visual final se relacionaba sólo con la agudeza visual al diagnóstico. Otro factor que no se ha tenido en cuenta en ninguno de estos estudios es el estado de las estructuras retinianas del paciente al inicio del tratamiento. Con

independencia de posibles influencias del genotipo, es razonable suponer que si los fotorreceptores estuvieran dañados irreversiblemente como consecuencia de la neovascularización, no se conseguiría mejorar la función visual del sujeto aunque la terapia con ranibizumab resultara eficaz para resolver el edema macular.

Tabla 5.4.- Estudios farmacogenéticos de la respuesta al tratamiento con ranibizumab intravítreo en la DMAE neovascular para los polimorfismos Y402H y A69S.

Polimorfismo <i>Gen</i>	Asociación Genotipo- Respuesta funcional	Asociación Genotipo-Nº de retratamientos
Y402H (rs1061170;T1277C) CFH	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NO^{251, 252, 299} ▪ TENDENCIA (no significativa): <ul style="list-style-type: none"> - Mejor respuesta del genotipo CC²⁵³ - Peor respuesta del genotipo CC²⁵⁴ ▪ SI <ul style="list-style-type: none"> - Peor respuesta del genotipo CC²⁵⁵ 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NO^{252,254} ▪ TENDENCIA (no significativa): <ul style="list-style-type: none"> - Genotipo CC asociado a riesgo de recibir mayor número de retratamientos²⁵¹
A69S (rs10490924;G270T) LOC387715/ARMS2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NO^{252,299} ▪ SI <ul style="list-style-type: none"> - Peor respuesta del genotipo TT²⁵⁴ 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NO²⁵²

Número de pacientes/ojos y tiempo de seguimiento en los estudios citados:

Ref. 251: Lee et al. 2009 : 156; 9 meses

Ref. 252: Orlin et al. 2012: 150; 2 años

Ref. 299: Yamashiro et al. 2012: 105, 1 año

Ref. 253: McKibbin et al. 2012: 104; 6 meses

Ref. 254: Teper et al. 2010: 90; 1 año

Ref. 255: Kloeckener-Gruissem et al. 2011: 243; 1 año

En cuanto a la posible influencia de los polimorfismos sobre el número de retratamientos, los datos son más escasos y parecen excluir una asociación entre los genotipos y esta variable. Sin embargo, hay que tener en cuenta que con una excepción²⁵², los tiempos de seguimiento no fueron superiores a un año. Esto puede justificar los resultados

obtenidos ya que nuestro estudio muestra que se requieren períodos más prolongados para detectar la influencia del alelo 69S.

Es difícil proponer una hipótesis para justificar por qué la presencia de esta variante del gen *LOC387715/ARMS2* se asocia al riesgo de recibir un mayor número de retratamientos considerando que la función del gen todavía no se ha establecido. Tampoco se conocen con precisión las causas y mecanismos moleculares que conducen a la DMAE exudativa (ni a la DMAE atrófica) que, según los conocimientos actuales, se han esquematizado en la Figura 5.4. Está claro que la neovascularización se asocia a un aumento de la producción de VEGF por las células del EPR que podría ser la respuesta de estas células ante una situación de hipoxia por disminución del flujo sanguíneo en la coriocapilar ³⁷, aunque se ha demostrado que el estrés oxidativo y la inflamación mediada por el sistema del complemento, condiciones que pueden concurrir en la DMAE, también estimulan la producción de VEGF por las células del EPR ^{39, 40, 46, 47}. Sea cual sea el proceso inductor, el VEGF actúa sobre los receptores de las células endoteliales promoviendo la formación y crecimiento de neovasos en el espacio sub-EPR y/o en el espacio intrarretiniano.

Ésta es la situación que encontramos en los pacientes al momento del diagnóstico. Puesto que ranibizumab bloquea al VEGF, es capaz de inhibir la angiogénesis patológica, eliminar sus manifestaciones y, eventualmente, conseguir una mejora de la función visual. Sin embargo no incide sobre la(s) causa(s) primaria(s) que provocaron el aumento de VEGF, por lo que es esperable que los pacientes puedan requerir retratamiento al cabo de un cierto tiempo si estas causas subsisten. Si los retratamientos se produjeran exclusivamente como consecuencia de la eliminación progresiva de ranibizumab de los compartimentos oculares, cabría esperar que ocurrieran a intervalos más o menos regulares y en todos los pacientes, lo que no sucede en la práctica. La gran variabilidad observada sugiere que debe estar implicado algún otro factor que no es común a todos los pacientes.

Una posibilidad es que la necesidad de retratamientos esté relacionada con la capacidad de los pacientes para reparar o preservar la integridad de la membrana de Bruch (que ya estaría comprometida a causa de las alteraciones provocadas por el envejecimiento, el principal factor de riesgo para la DMAE). Este complejo de matriz extracelular estratificada,

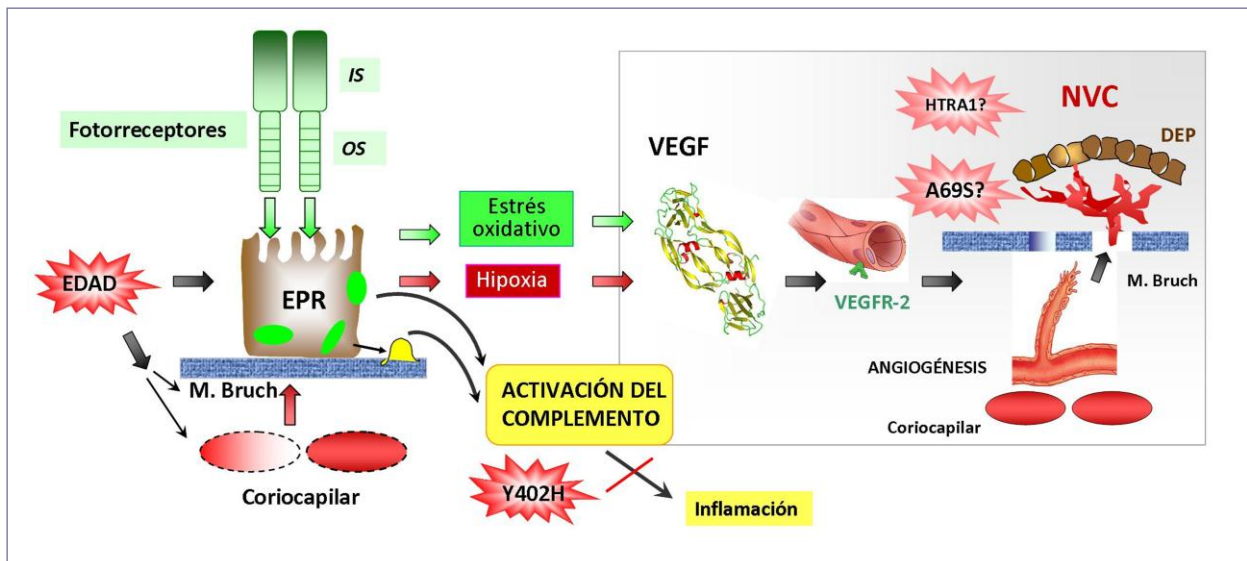


Figura 5.4.- Patogénesis de la DMAE neovascular. (1) El proceso de fagocitosis de la porción distal de los segmentos externos de los fotorreceptores es muy activo en el EPR macular. Con la edad y en la DMAE disminuye la eficacia del procesamiento lisosomal del material fagocitado, se acumulan cuerpos residuales en el EPR y desechos en la membrana de Bruch, y se origina daño oxidativo en el EPR. (2) Cambios en la coriocapilar y/o la membrana de Bruch pueden provocar hipoxia en las células del EPR. (3) La activación incontrolada del complemento conduce a inflamación crónica y daño celular. (4) La hipoxia, el estrés oxidativo y/o la inflamación conduce al aumento de los niveles de VEGF y a la angiogénesis patológica. (5) Los neovasos coroideos invaden el espacio sub-EPR a través de brechas o discontinuidades en la membrana de Bruch.

además de su importancia en la fisiología ocular, supone una barrera física al paso de células entre la coroides y la retina. En consecuencia, el mantenimiento de la integridad de esta estructura es esencial para impedir la penetración de los neovasos en la retina. De hecho, se ha observado que la membrana de Bruch es más delgada en pacientes con DMAE neovascular (no así en aquellos con atrofia geográfica) y presenta discontinuidades de 9-10 micras de longitud a través de las cuales los neovasos coroideos invaden el espacio subretiniano²⁵. El gen *LOC387715/ARMS2* podría estar relacionado con la homeostasis de esta matriz extracelular, de forma que en los sujetos homocigotos para el alelo de riesgo del polimorfismo A69S estarían perturbados los mecanismos de reparación y mantenimiento de la membrana de Bruch por carecer de la proteína ARMS2 funcional.

A favor de esta hipótesis se pueden citar estas evidencias: *i)* el polimorfismo A69S está fuertemente asociado con las formas neovasculares de la DMAE^{150, 281, 282}; *ii)* en retina humana, ARMS2 se ha localizado en las columnas intercapilares y en la matriz adyacente a la membrana de Bruch¹⁵³; *iii)* ARMS2 interacciona específicamente *in vitro* con un conjunto de proteínas como fibronectina, colágenos y fibulinas, que son constituyentes de matriz

extracelular y/o están implicadas en el ensamblaje y estabilización de estas estructuras¹⁵³; iv) se han identificado variantes que confieren susceptibilidad para la DMAE en otros genes que codifican proteínas relacionadas con matriz extracelular como *HMCN1*, *FBLN5*, *COL10A1*, *COL8A1* y *TIMP3*¹²³. Conviene recordar que A69S se encuentra en el mismo haplotipo de riesgo que los polimorfismos del443ins54 (indel) de la región 3'-UTR del gen *LOC387715/ARMS2* y rs11200638 del promotor del gen *HTRA1*¹⁴⁰. El primero de ellos se ha asociado con niveles indetectables de la proteína *ARMS2*^{140, 144, 145}, y el segundo con sobreexpresión de *HTRA1*^{137, 138, 140}. Esta serina proteasa está implicada en la degradación de elastina, fibulina 5 y otras proteínas de matriz extracelular, lo que provoca fragmentación de la membrana de Bruch y neovascularización en modelos animales^{300, 301}. Por tanto, si la asociación del locus 10q26 con la DMAE no fuera debida al polimorfismo A69S, sino a cualquiera de los otros dos polimorfismos del haplotipo de riesgo, también se podrían ver afectados los procesos de homeostasis de la matriz extracelular.

Una objeción a esta hipótesis es que presupone que las recurrencias implican la repetición de los episodios de neovascularización favorecidos por la presencia de una membrana de Bruch defectuosa. Sin embargo, también podría ocurrir que después de la dosis de carga de la terapia antiangiogénica se estabilizaran los neovasos originales presentes al diagnóstico de la DMAE y se resolviera el edema macular por reabsorción. En este caso, las recurrencias supondrían la reactivación de dichos vasos anómalos y la exudación de nuevo fluido por aumento de la permeabilidad inducido por VEGF, sin necesidad de infiltración de nuevo tejido patológico. Probablemente pueden coexistir ambos procesos ya que mediante angiografía con fluoresceína y verde de indocianina se han observado tras la dosis de carga con el agente antiangiogénico distintos patrones de respuesta indicativos de regresión total o parcial, estabilización, y aumento del tamaño de la lesión^{302, 303}. Particularmente interesante es que el patrón angiográfico en AFG parece estar relacionado con el número de retratamientos³⁰².

Finalmente hay que considerar que ranibizumab resulta eficaz para eliminar rápida y sustancialmente el fluido intra y sub-retiniano en la mayoría de los pacientes aunque en algunos casos no se consigue resolver el edema macular tras la dosis de carga. Estos pacientes requerirán reinyección según los criterios de retratamiento pero no cabe hablar de verdaderas

recurrencias. Quizás en estos sujetos fallan los mecanismos que permiten el drenaje del fluido macular, o bien el nivel de VEGF es muy elevado de forma que no resulta neutralizado por las dosis estándar de ranibizumab.

- *Consideraciones metodológicas y posibles aplicaciones de los resultados del estudio a la práctica clínica*

Las fortalezas de este estudio son su representatividad de un régimen terapéutico empleado en la práctica clínica real, el rigor y uniformidad de criterios en la aplicación del protocolo de la terapia con ranibizumab por tratarse de un estudio unicéntrico, el largo período de seguimiento de los pacientes, que alcanzó los tres años en una parte de la muestra inicial, y el hecho de que los pacientes incluidos no hubieran recibido en ningún caso tratamientos previos que pudieran distorsionar los resultados. Los tres oftalmólogos del Servicio dedicados al diagnóstico, prescripción de tratamiento y seguimiento de los pacientes (los mismos desde el año 2006) no han conocido su perfil genético para evitar sesgos en el seguimiento. La principal limitación de la investigación es el número relativamente modesto de pacientes incluidos, al igual que sucede en los estudios citados en la Tabla 5.4. Cabe suponer que aumentando el tamaño de la muestra, aumentaría la potencia de los análisis estadísticos y probablemente las tendencias observadas en ciertos casos alcanzarían significación estadística.

Una consideración metodológica importante es que por tratarse de un estudio retrospectivo fue posible incluir en la muestra final pacientes representativos de los diferentes tipos de respuesta observados en la práctica clínica. En un estudio con pacientes consecutivos no habría sido posible conseguir una muestra con estas características, ya que aquellos pacientes que requieren pocos o ningún retratamiento son menos numerosos. Posiblemente, este criterio ha permitido detectar la influencia del genotipo para el polimorfismo A69S sobre la necesidad de retratamientos. Este hallazgo es muy interesante y podría ayudar a optimizar el manejo de los pacientes diagnosticados de DMAE neovascular. Una vez conocido el genotipo, se podría extremar la vigilancia en aquellos con mayor riesgo de recurrencias y espaciar las visitas de los que presentasen el genotipo favorable con la consiguiente descarga

de los servicios asistenciales. En todo caso, antes del empleo de este polimorfismo como factor predictivo de la necesidad de retratamientos, nuestros resultados deberían replicarse en más estudios, con un mayor número de pacientes y con seguimientos prolongados. Igualmente sería necesario realizar un estudio coste-beneficio de la introducción del genotipado del paciente en la práctica clínica.

Por otra parte, según los resultados obtenidos en esta investigación, ninguno de los dos polimorfismos analizados presenta valor predictivo de la respuesta funcional a la terapia con ranibizumab. Considerando la complejidad del proceso, es probable que esté relacionado con un mayor número de factores genéticos, que podrían o no interactuar, incidiendo de manera beneficiosa o desfavorable sobre la respuesta individual. Este campo de investigación es muy prometedor y previsiblemente, permitirá en un futuro dilucidar la arquitectura farmacogenética completa de la terapia antiangiogénica para la DMAE neovascular.

En conclusión:

- **La terapia con ranibizumab consistente en dosis de carga y régimen *pro re nata* con los criterios de retratamiento del estudio PrONTO es eficaz en la práctica clínica real para mejorar la visión de los pacientes con DMAE neovascular. No obstante, la mejoría visual media conseguida tras la dosis de carga parece reducirse significativamente (44%) tras tres años de seguimiento.**
- **El número de inyecciones que reciben los pacientes durante el período de seguimiento no está relacionado con la agudeza visual al final del mismo.**
- **No se ha detectado asociación de los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* con la respuesta funcional a la terapia con ranibizumab. La aparente relación encontrada entre el genotipo para el polimorfismo Y402H y los resultados funcionales no es real. Éstos están relacionados con la agudeza visual en el momento del diagnóstico.**
- **El polimorfismo A69S está relacionado con el número de retratamientos: el genotipo homocigoto para la variante 69S (TT) se asocia con un mayor número de retratamientos tras la dosis de carga.**

5.5.- PARÁMETROS TOMOGRÁFICOS COMO FACTORES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA FUNCIONAL A LA TERAPIA CON RANIBIZMAB

Los resultados de esta investigación muestran que la terapia con ranibizumab consistente en dosis de carga inicial y régimen PRN resulta eficaz, en general, para mejorar la visión de los pacientes. Los efectos más pronunciados se consiguen con la fase de carga inicial, mientras que en el período posterior no ocurren mejoras sustanciales de la función visual, e incluso parece observarse un lento declinar. Sin embargo, la respuesta individual es variable, y no en todos los casos se produce una mejoría de la agudeza visual aún cuando se consiga resolver el edema macular. La OCT de dominio espectral permite una visualización detallada de las estructuras retinianas, por lo que se ha considerado interesante analizar los efectos del tratamiento con ranibizumab sobre la morfología macular para tratar de relacionar los cambios morfológicos con la función visual y, eventualmente, identificar parámetros tomográficos con valor predictivo del resultado funcional. Nuestra aproximación ha sido determinar en el momento del diagnóstico, tras la fase de carga, y a los doce meses de seguimiento los siguientes parámetros: el espesor retiniano central (CRT), la altura y extensión de las alteraciones retinianas secundarias al proceso neovascular, y el estado de conservación de las líneas IS/OS y MLE.

El valor medio del CRT descendió tras la fase de carga, fundamentalmente debido a la reabsorción del edema macular, y posteriormente se mantuvo sin cambios significativos hasta los doce meses. Se encontró una correlación negativa entre el CRT inicial y la agudeza visual al diagnóstico. Esto es razonable puesto que la presencia de fluido distorsiona la morfología macular lo cual, muy probablemente, afecta al funcionamiento de los fotorreceptores. Sin embargo, el CRT tras la dosis de carga, o el CRT final, no se correlacionan con la agudeza visual final, lo que sugiere que la mera resolución del edema macular es condición necesaria pero no suficiente para restablecer la visión y que otros factores deben influir en la recuperación de la agudeza visual.

Un candidato lógico es el estado de los fotorreceptores. La banda hiperreflectiva correspondiente a la línea IS/OS en las tomografías representa la zona de unión entre los segmentos externos altamente organizados de los fotorreceptores y los segmentos internos.

Por encima de ella, la línea MLE parece identificar la región entre los segmentos internos de los fotorreceptores, con las zónulas adherentes de las células de Müller, y la capa externa nuclear que comprende los cuerpos celulares de los fotorreceptores³⁰⁴ (Figura 5.5).

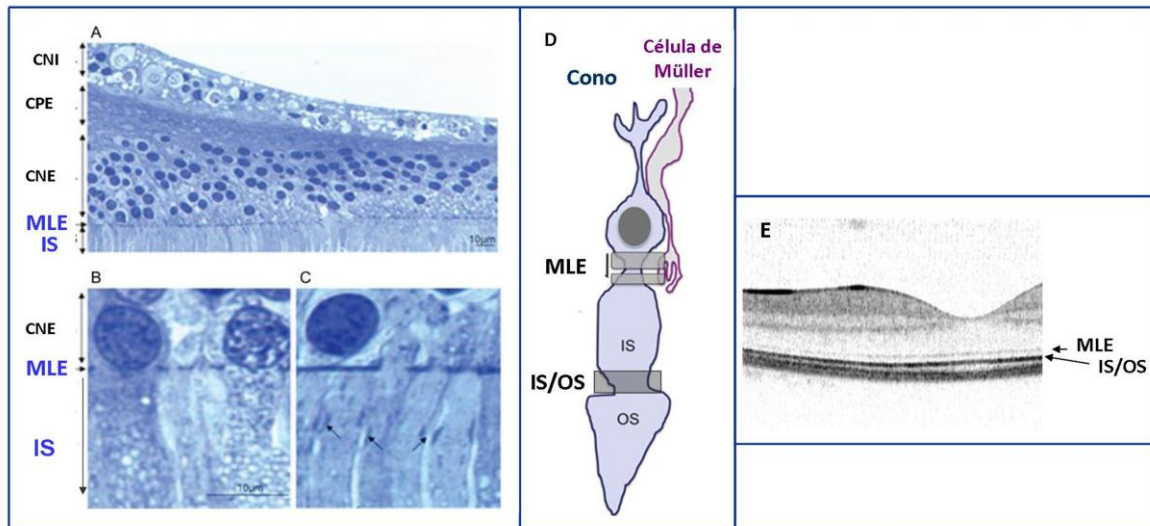


Figura 5.5.- Izquierda: Secciones semifinas de una mácula humana que muestran la localización de la membrana limitante externa (MLE) en la región macular (A), en la mácula periférica (B) y en la fóvea (C). Tomada de Omri *et al.*³⁰⁴ Centro: Representación esquemática de un cono que muestra la MLE, en la que se localizan las uniones entre el fotorreceptor y las células de Müller mediante proteínas de adhesión, y la región de unión de los segmentos internos y externos del fotorreceptor (IS/OS). Derecha: Imagen tomográfica con SD-OCT (Spectralis) de una mácula normal donde se visualizan las bandas correspondiente a las distintas capas retinianas. Se indican las líneas correspondientes a la MLE y a la unión IS/OS. Abreviaturas: CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa.

Al diagnóstico, se visualizó desestructuración severa o total de la línea IS/OS en un 76.5% de los pacientes, lo que sugiere daño a los fotorreceptores inducido por la NVC, o bien un bloqueo de la señal de reflectancia procedente de éstos. Tras la fase de carga con ranibizumab, un 31,9% de los pacientes mejora el estado de conservación de la línea IS/OS. En modelos animales, se ha comprobado que la degeneración de los conos comienza con la pérdida de los segmentos externos, mientras que la muerte celular ocurre mucho más tardíamente³⁰⁵. Por tanto, la desestructuración de la línea IS/OS probablemente refleja daño a los segmentos externos, los cuales podrán regenerarse siempre y cuando el cuerpo celular se mantenga indemne. En condiciones fisiológicas, la renovación completa de los segmentos externos de los fotorreceptores se efectúa en unos 10 días^{9, 11}, de forma que el período de la fase de carga debería ser suficiente para permitir la recuperación estructural de los fotorreceptores, una vez resuelto el edema macular. La restauración de la línea IS/OS justifica

la mejoría de agudeza visual conseguida tras la fase de carga, puesto que los segmentos externos son los responsables del proceso de fototransducción. La relación entre los cambios anatómicos y la función visual explica que:

i) la agudeza visual media no mejore significativamente a los doce meses con respecto a la conseguida al final de la fase de carga (Figuras 4.13 y 4.30), ya que en este período no ocurren cambios sustanciales en el estado de conservación de la línea IS/OS considerando el conjunto de la muestra (Figuras 4.29 y 4.30, y Tabla 4.25).

ii) los pacientes que no logren mejorar tras la fase de carga una línea IS/OS inicial totalmente desestructurada, tengan poca probabilidad de conseguirlo en el período posterior (sólo 3 de 21, es decir un 14%). La consecuencia es que no hay mejoría de la agudeza visual. Por el contrario, un buen estado de la línea IS/OS después de la dosis de carga puede ser un factor pronóstico de buena función visual final.

iii) el CRT al final de doce meses (o tras la dosis de carga) no presente una correlación estadísticamente significativa con la agudeza visual final, ya que ésta dependerá del estado de los fotorreceptores. Un valor normalizado del CRT no implica integridad de los mismos. Puede resultar sorprendente que el CRT inicial sí se correlacione con la agudeza visual final ($R = -0,51$; $p < 0,001$). Probablemente, un valor alto del CRT al diagnóstico refleja un mayor tiempo de evolución del proceso patológico y/o una mayor agresividad del mismo, lo que se traduciría en más daño a los fotorreceptores.

iv) el estado de la línea IS/OS se correlacione en todo momento con la agudeza visual. La correlación más estrecha se ha hallado entre los pares [agudeza visual final- IS/OS al final de la dosis de carga] y [agudeza visual final- IS/OS final] (Tabla 4.24), lo que parece razonable al haber eliminado los efectos del edema macular.

En cuanto a la línea MLE, el grado medio de conservación al diagnóstico es mejor que el de la línea IS/OS. Teniendo en cuenta las estructuras retinianas representadas por la línea MLE, es probable que su desestructuración refleje un daño más severo de los fotorreceptores, quizá su completa degeneración. En consecuencia, la plasticidad de la línea MLE es menor que la de la línea IS/OS, ya que el restablecimiento de su integridad debe ser difícil o imposible. Como muestran nuestros resultados, la conservación de la línea MLE parece ser un requisito

imprescindible para la mejoría de la línea IS/OS. Además, los casos en los que no se visualiza la primera, tampoco se detecta la segunda.

La importancia de una MLE preservada como condición para la recuperación futura de la función visual se deduce a partir de los coeficientes de correlación entre este parámetro morfológico y la agudeza visual (véase Tabla 5.5). Al igual que sucede con la línea IS/OS, el estado de la línea MLE al inicio y tras la dosis de carga también se correlaciona con la agudeza visual final. En consecuencia, ambos parámetros parecen tener valor como factores pronóstico de la función visual.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con ranibizumab resulta eficaz para mejorar el estado de las estructuras retinianas. Tras la dosis de carga, un 90-91% de los pacientes consiguió mejorar o conservar el estado de las líneas IS/OS y MLE respecto a su situación al diagnóstico. A los doce meses, este porcentaje se mantuvo para la línea IS/OS aunque descendió al 75% para la línea MLE. Resulta llamativo que 12 pacientes (un 25% del total) empeorasen el estado de la MLE con respecto al diagnóstico, teniendo en cuenta que en todos los casos se realizó el seguimiento y control habitual. Este empeoramiento no se acompañaba de aumento de la extensión o altura de la lesión, ni de un incremento del CRT. De hecho, el valor medio del CRT de estos pacientes fue de 293 micras (DS 121), y en 4 de ellos estaba comprendido entre 150 y 200 micras. La Figura 5.6 presenta las imágenes tomográficas de uno de ellos.

En las imágenes se aprecia completa resolución del edema macular, pero también atrofia retiniana y reemplazamiento de las líneas IS/OS y MLE por depósitos densos. El paciente recibió 6 inyecciones de ranibizumab. La razón de estos cambios desfavorables no está clara pero, nuevamente, apuntan a la posibilidad de un efecto neurotóxico debido a ranibizumab.

Recientes estudios sobre la DMAE neovascular han demostrado que la integridad de los fotorreceptores es importante para la visión. La continuidad de la línea IS/OS se asocia con buena agudeza visual en pacientes tratados con TPD^{306, 307} o agentes antiangiogénicos^{308, 309}. También mediante microperimetría se ha confirmado la asociación del estado de la línea IS/OS con la sensibilidad retiniana³¹⁰. Igualmente, se ha hallado correlación entre el estado de la

línea MLE con la agudeza visual tras TPD³⁰⁷ o terapia antiangiogénica³⁰⁹. Sin embargo, estos estudios se han limitado a analizar la posible correlación entre el estado de las capas foveales

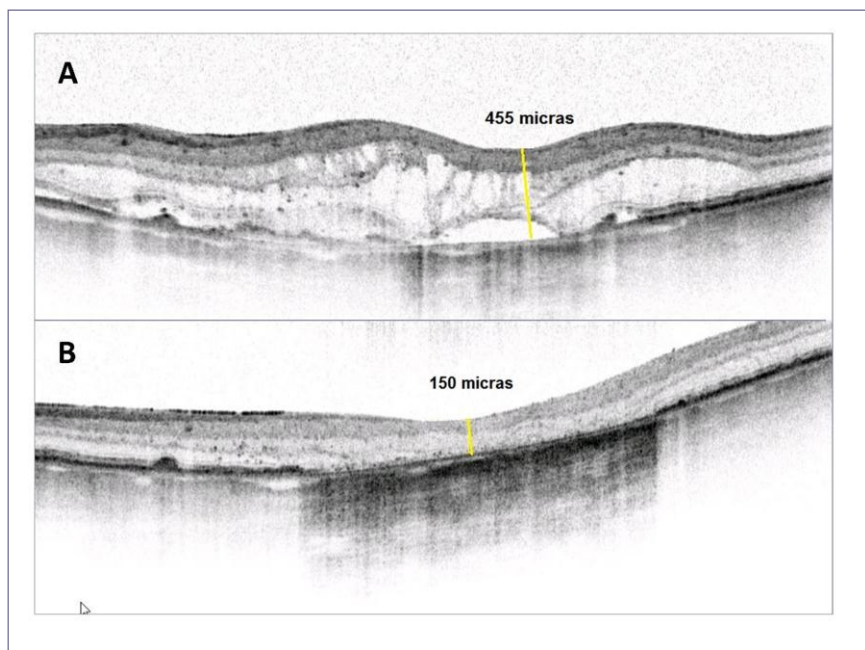


Figura 5.6.- Imágenes tomográficas de la macula de un paciente que mostró empeoramiento y aparente desaparición de la línea MLE a los doce meses. (A) Mácula al diagnóstico. Presencia de líquido intra y subretiniano y ausencia aparente del EPR en el área central. (B) Mácula a los doce meses. Aplanamiento del contorno macular y ausencia total de líquido. Se constata la atrofia de fotorreceptores y EPR. Depósitos densos ocupan el lugar de las líneas IS/OS y MLE.

en la visita final y la agudeza visual en ese momento, lo cual es interesante pero no resulta de utilidad para predecir la respuesta visual del paciente al tratamiento. En nuestra investigación se pretendía la identificación de parámetros tomográficos con valor predictivo de la función visual final, por lo cual se analizó mediante SD-OCT la evolución de la morfología macular durante el tratamiento con ranibizumab. La Figura 5.7 recoge los parámetros tomográficos con capacidad predictiva de la función visual, que podrían ser de utilidad para orientar el manejo de los pacientes con DMAE neovascular en la práctica clínica. Aunque el estatus de la línea IS/OS y MLE al diagnóstico y tras la fase de carga se correlacionan con la agudeza visual final, el modelo en el análisis de regresión múltiple muestra que los factores que contribuyen al pronóstico visual son la agudeza visual al diagnóstico y el estado de la línea IS/OS al final de la fase de carga.

Sólo tres estudios, publicados en 2012, han evaluado la capacidad de los parámetros tomográficos para predecir el resultado funcional tras terapia antiangiogénica, sola o en combinación con TPD. En la Tabla 5.5 se recogen los resultados obtenidos y se comparan con los de la presente investigación.

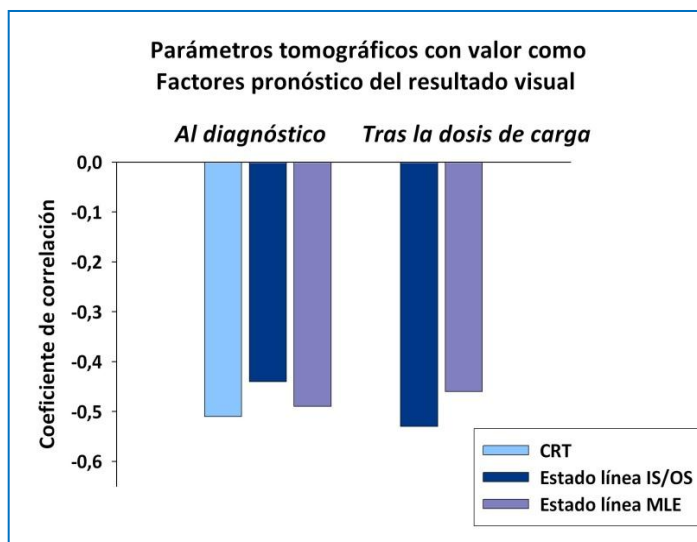


Figura 5.7.- Parámetros tomográficos con capacidad predictiva de la agudeza visual final. Al diagnóstico: CRT, $p < 0,001$; estado de la línea IS/OS (puntuación), $p = 0,001$; estado de la línea MLE (puntuación), $p = 0,0004$. Tras la dosis de carga: estado de la línea IS/OS, $p = 0,0001$; estado de la línea MLE, $p = 0,001$.

En un caso, no se ha encontrado correlación entre la agudeza visual final y el CRT o el estado de las líneas IS/OS y MLE al diagnóstico³¹¹. Probablemente, el tiempo de seguimiento es muy reducido ya que el resultado funcional se valoró tras la dosis de carga. En los otros dos estudios^{312, 313}, con períodos de seguimiento más prolongados, también se ha hallado que el estado de las líneas IS/OS y MLE al inicio se correlacionan con la agudeza visual final. Sin embargo, una diferencia importante con nuestro estudio es que no se valoraron estos parámetros tras la fase de carga, a pesar de que en este período se producen los cambios más relevantes. Esto puede explicar el distinto resultado tras el análisis de regresión múltiple respecto al parámetro tomográfico con valor predictivo: MLE³¹², ninguno³¹³, o línea IS/OS tras fase de carga (en esta Tesis). No obstante, en coincidencia con nuestros datos, la agudeza visual inicial se muestra como un importante factor predictivo de la visión final.

Tabla 5.5.- Validez de los parámetros tomográficos como factores predictivos del resultado funcional tras terapia antiangiogénica.

Estudio Tiempo de seguimiento	Parámetros OCT con valor predictivo de la AV final	Correlación Parámetro-AV final		Tras regresión múltiple
		R	p	
Akagi-Kurashige et al. ³¹² 12 meses Anti-VEGF con o sin TPD	Estado línea IS/OS inicial	- 0,42	<0,001	MLE inicial
	Estado línea MLE inicial	- 0,55	<0,001	AV inicial
Gamulesco et al. ³¹¹ 3 meses Ranibizumab	Ninguno	–	–	–
Oishi et al. ³¹³ 7,7 ± 1,9 meses Ranibizumab	CRT inicial	-0,46	<0,001	AV inicial
	Estado línea IS/OS inicial	-0,39	0,001	
	Estado línea MLE inicial	-0,51	<0,001	
Este estudio 12 meses Ranibizumab	CRT inicial	-0,51	<0,001	
	Estado línea IS/OS inicial	-0,44	0,001	
	Estado línea MLE inicial	-0,49	0,0004	IS/OS tras carga
	Estado línea IS/OS tras carga	- 0,53	0,0001	AV inicial
	Estado línea MLE tras carga	- 0,46	0,001	

Finalmente, hay que resaltar que en esta Tesis se ha estudiado por primera vez la relación de los genotipos para los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* con las características de la morfología macular en el momento del diagnóstico y su posible influencia sobre la evolución de los parámetros tomográficos durante doce meses de tratamiento con ranibizumab. No se ha encontrado ninguna correlación, excepto en el caso de la línea IS/OS. El genotipo homocigoto para el alelo de riesgo del polimorfismo Y402H parece estar asociado a una evolución desfavorable del estado de conservación de los fotorreceptores, lo que podría justificar por qué los pacientes que poseen el genotipo CC consiguen menor ganancia de agudeza visual tras tratamiento a un año.

- *Limitaciones del estudio*

Las principales limitaciones del presente estudio incluyen su carácter retrospectivo, el modesto número de pacientes, y las derivadas de la propia naturaleza de la OCT. Hay que tener en cuenta que las características visualizadas en las imágenes de OCT reflejan las diferencias en reflectancia de la luz de las microestructuras anatómicas, y no a éstas en sí mismas. Así, las alteraciones observadas en las líneas IS/OS y MLE son en realidad parámetros tomográficos con relevancia clínica pero no se deben interpretar directamente como cambios histopatológicos. Por otra parte, las propias características de la DMAE pueden dificultar en ocasiones el análisis de las imágenes de OCT, ya que frecuentemente se observa en ellas más distorsión que en otras patologías retinianas. Así, en algún caso una aparente mejora del estado de estas líneas respecto a su situación al diagnóstico podría ser el resultado de una mejor visualización más que una verdadera recuperación, lo que daría lugar a un falso positivo.

Otra cuestión a considerar es que los parámetros tomográficos tienen valor predictivo del resultado funcional pero ni en esta Tesis, ni en los dos estudios mencionados, se han obtenido coeficientes de correlación próximos a la unidad. Esto indica que hay otros factores relacionados con la función visual final. Uno evidente podría ser la duración de los síntomas antes de comenzar el tratamiento, información de la que habitualmente no se dispone. Es muy probable que este período de evolución de la patología condicione la agudeza visual inicial que, como hemos visto, se muestra como un importante factor predictivo de la visión final. También sería necesario realizar investigaciones para estudiar si diversos factores neurotróficos, cuyos niveles pueden ser diferentes en los pacientes, pueden jugar un papel importante en los procesos de regeneración de las estructuras retinianas dañadas en la DMAE.

En todo caso, considerando la importancia de la integridad de los fotorreceptores para la función visual, sería deseable introducir modificaciones en la terapia antiangiogénica con un doble objetivo: favorecer la regeneración de los fotorreceptores dañados y minimizar el posible daño a la retina durante el tratamiento. Es de esperar que los avances tecnológicos en los sistemas de OCT, el descubrimiento de nuevos factores relacionados con la mejora de la función visual, y la identificación de los factores genéticos implicados en la respuesta a la

terapia antiangiogénica, permitan elaborar algoritmos con alto valor predictivo del resultado funcional.

En conclusión:

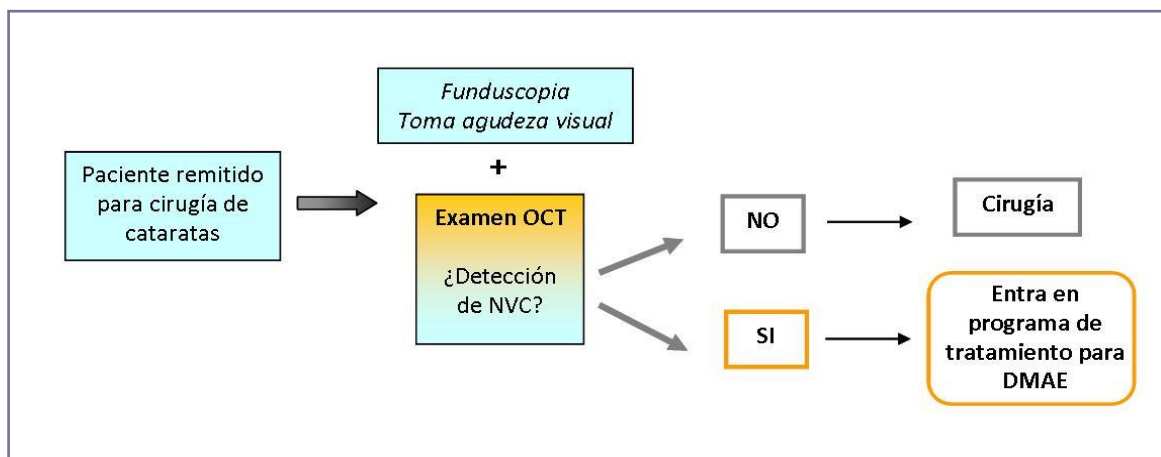
- Al diagnóstico, el CRT y el estado de conservación de las líneas IS/OS y MLE se correlacionan con la agudeza visual inicial.
- A los doce meses de seguimiento, la agudeza visual se relaciona con el estado de conservación de las líneas IS/OS y MLE pero no con el valor del CRT.
- Los parámetros tomográficos con valor predictivo de la agudeza visual final en los análisis univariantes son: CRT inicial y estado basal de las líneas IS/OS y MLE, y estado de las líneas IS/OS y MLE tras la dosis de carga con ranibizumab. El análisis de regresión múltiple muestra que los factores pronóstico del resultado funcional son la agudeza visual inicial y el estado de conservación de la línea IS/OS tras la dosis de carga con el agente antiangiogénico.
- No se ha detectado asociación de los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* con las características de la morfología macular al diagnóstico, ni con la evolución de los parámetros tomográficos durante doce meses de tratamiento con ranibizumab excepto en el caso de la línea IS/OS. El genotipo homocigoto para el alelo de riesgo del polimorfismo Y402H parece estar asociado a una evolución desfavorable de este parámetro tomográfico.

5.6.- INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS Y POSIBLE APLICACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA

Del conjunto de resultados de esta Tesis Doctoral se puede extraer información de utilidad para el manejo en la práctica clínica de los pacientes afectados por DMAE neovascular. En primer lugar, se ha demostrado que la SD-OCT es un método idóneo para la detección de la presencia de NVC en pacientes remitidos para cirugía de cataratas, por lo que se propone el empleo de este procedimiento de forma rutinaria. En relación con el tratamiento de la DMAE neovascular, se han evaluado los resultados de la terapia con ranibizumab en régimen PRN, durante períodos de seguimiento de hasta tres años, y se ha investigado la posible relación de los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2*, y de diversos parámetros tomográficos con la respuesta de los pacientes al tratamiento con el agente antiangiogénico. Los resultados obtenidos han permitido identificar factores con valor predictivo del resultado funcional que podrían ser utilizados para orientar el seguimiento de los pacientes con DMAE exudativa.

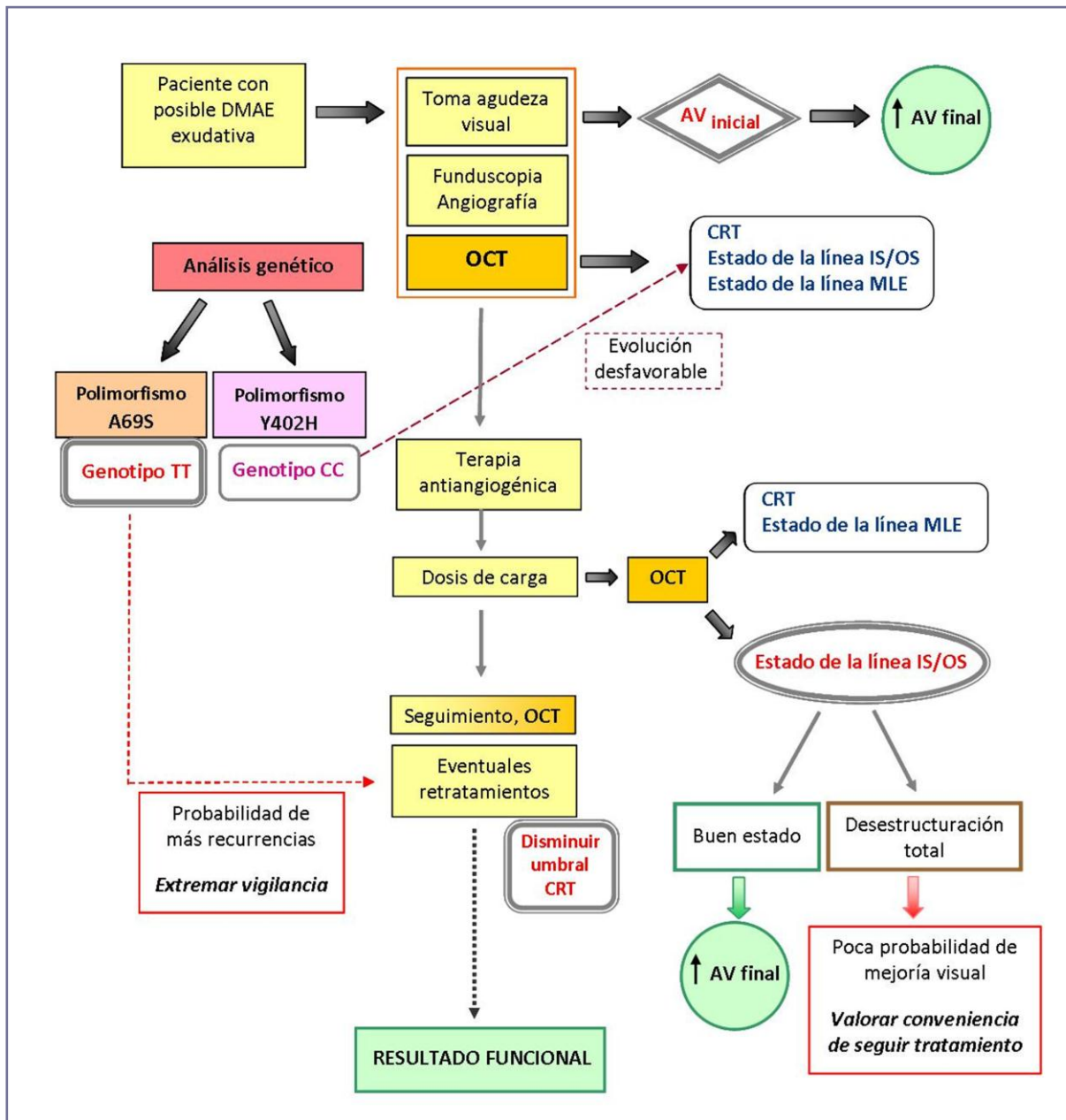
Los esquemas que se presentan a continuación muestran cómo pueden incorporarse estos hallazgos a los protocolos actuales y cuál sería la información de relevancia para la práctica clínica respecto al tratamiento de los pacientes con DMAE neovascular.

Protocolo 1.- Incorporación de la OCT de dominio espectral para la detección de posible neovascularización subyacente a cataratas, con carácter previo a la intervención quirúrgica.



Protocolo 2.- Incorporación al protocolo de seguimiento habitual de los pacientes con DMAE neovascular de los factores con valor predictivo de la respuesta al tratamiento con ranibizumab (parámetros tomográficos determinados por OCT de dominio espectral y resultados de los análisis genéticos).

DISCUSIÓN



Indica las etapas del protocolo habitual de diagnóstico de DMAE neovascular, tratamiento con ranibizumab y seguimiento de los pacientes.

Rodean a los factores con valor predictivo del resultado funcional (**agudeza visual inicial** y **estado de conservación de la línea IS/OS tras la fase de carga**), al genotipo relacionado con la necesidad de retratamientos (**TT respecto al polimorfismo A69S**), y al parámetro tomográfico cuyo valor umbral indicativo de retratamiento debería ser modificado (**CRT**).

6. CONCLUSIONES

- 1.** La tomografía de coherencia óptica de dominio espectral resulta extremadamente útil en la evaluación de pacientes en riesgo de progresión en la DMAE. Las medidas realizadas con Spectralis muestran una excelente reproducibilidad.
- 2.** La cirugía de cataratas mediante facoemulsificación no constituye un factor de riesgo para el desarrollo a corto-medio plazo de neovascularización coroidea y contribuye a mejorar la agudeza visual de los pacientes con DMAE incipiente.
- 3.** La terapia con ranibizumab en régimen PRN es eficaz para mejorar la visión de los pacientes con DMAE neovascular. Tras uno, dos y tres años de seguimiento, el porcentaje de pacientes que recuperó en algún grado la agudeza visual fue del 74, 71 y 63, respectivamente. Al final de estos períodos entre un 29 y un 23% de los pacientes consiguieron una ganancia de quince o más letras ETDRS, umbral que supone una importante mejora de la calidad de vida.
- 4.** El número de inyecciones que reciben los pacientes durante el período de seguimiento no está relacionado con la agudeza visual al final del mismo.
- 5.** Los polimorfismos Y402H del gen *CFH* y A69S del gen *LOC387715/ARMS2* están estrechamente asociados con la DMAE neovascular en pacientes españoles de la Comunidad de Madrid. Una copia del alelo de riesgo C (polimorfismo Y402H) duplica la posibilidad de padecer la patología. Dos copias la multiplican por seis. La asociación es más fuerte para el polimorfismo A69S, ya que el alelo T en heterocigosis u homocigosis aumenta este riesgo tres y veintitrés veces, respectivamente.
- 6.** La presencia en homocigosis del alelo de riesgo del polimorfismo A69S se asocia a un mayor número de tratamientos a largo plazo con ranibizumab intravítreo.
- 7.** No se ha encontrado relación entre los polimorfismos Y402H y A69S con la respuesta funcional.

- 8.** La agudeza visual inicial es el más importante factor predictivo de la agudeza visual final, independientemente de la carga genética.

- 9.** El espesor retiniano central inicial y el estado de conservación de las líneas IS/OS y MLE basal y tras dosis de carga, determinados por tomografía de coherencia óptica de dominio espectral se correlacionan con la agudeza visual final al año.

- 10.** El genotipo de riesgo para el polimorfismo Y402H se relaciona con una evolución desfavorable del estado de conservación de la línea IS/OS tras doce meses de tratamiento con ranibizumab.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Augood CA, Vingerling JR, de Jong PT, Chakravarthy U, Seland J, Soubrane G, et al. Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch Ophthalmol*. 2006; 124:529-535.
2. Klein R, Cruickshanks, KJ, Nash SD, Krantz EM, Nieto FJ, Huang GH, et al. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors: the Beaver Dam Offspring Study. *Arch Ophthalmol*. 2010; 128:750-758.
3. de Jong PT, Chakravarthy U, Rahu M, Seland J, Soubrane G, Topouzis F, et al. Associations between aspirin use and aging macula disorder: the European Eye Study. *Ophthalmology*. 2012; 119:112-118.
4. Klein R, Chou CF, Klein BE, Zhang X, Meuer SM, Saaddine JB. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch Ophthalmol*. 2011; 129:75-80.
5. Vanderbeek BL, Zacks DN, Talwar N, Nan B, Musch DC, Stein JD. Racial differences in age related macular degeneration rates in the United States: a longitudinal analysis of a managed care network. *Am J Ophthalmol*. 2011; 152:273-282.
6. Casaroli-Marano R, Pieñro A, Adan A, Castro J, Armada F, Cervera E, and the Spanish Eyes Epidemiological (SEE) Study Group. Prevalence of age-related macular degeneration in Spain. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95: 931-936.
7. Hutchinson J, Tay W. Symmetrical central choroidoretinal disease occurring in senile persons. *R Lond Ophthal Hosp Rep*. 1875; 8:231-244.
8. Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol*. 1990; 292:497-523.
9. Mustafi D, Engel AH, Palczewski K. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res*. 2009; 28:289-302.
10. Bhutto I, Luttly G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med*. 2012; 33:295-317.
11. Sung CH, Chuang JZ. The cell biology of vision. *J Cell Biol*. 2010; 190:953-963.
12. Wolf-Schnurrbusch UE, Enzmann V, Brinkmann CK, Wolf S. Morphologic changes in patients with geographic atrophy assessed with a novel spectral OCT-SLO combination. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:3095-3099.
13. Fleckenstein M, Charbel Issa P, Helb HM, Schmitz-Valckenberg S, Finger RP, Scholl HP, et al. High-resolution spectral domain-OCT imaging in geographic atrophy associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:4137-4144.
14. Hayashi H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Ota M, Otani A, Yoshimura N. Association between foveal photoreceptor integrity and visual outcome in neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2009; 148:83-89.
15. Bird AC. Therapeutic targets in age-related macular disease. *J Clin Invest*. 2010; 120:3033-3041.
16. Yehoshua Z, Rosenfeld PJ, Gregori G, Feuer WJ, Falcao M, Lujan BJ, et al. Progression of geographic atrophy in age-related macular degeneration imaged with spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2011; 118:679-686.
17. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005; 85:845-881.
18. Booi JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res*. 2010; 29:1-18.

19. Ebrahimi KB, Handa JT. Lipids, lipoproteins, and age-related macular degeneration. *J Lipids* 2011; 2011:802059.
20. Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)*. 2001;15:384-389.
21. Finnemann SC, Leung LW, Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:3842-3847.
22. Schmack I, Kang SJ, Grossniklaus HE. Histopatología de la degeneración macular asociada a la edad. En: Monés J y Gómez-Ulla F editores. "Degeneración macular asociada a la edad" Barcelona, Prous Science; 2005. pp.: 73-84.
23. Zhou J, Kim SR, Westlund BS, Sparrow JR. Complement activation by bisretinoid constituents of RPE lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:1392-1399.
24. Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, Bennett KL, Scholl HP, Charbel Issa P, et al. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature*. 2011; 478:76-81.
25. Chong NH, Keonin J, Luthert PJ, Frennesson CI, Weingeist DM, Wolf RL, et al. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. *Am J Pathol*. 2005; 166:241-251.
26. van Soest SS, de Wit GM, Essing AH, ten Brink JB, Kamphuis W, de Jong PT, et al. Comparison of human retinal pigment epithelium gene expression in macula and periphery highlights potential topographic differences in Bruch's membrane. *Mol Vis*. 2007; 13:1608-1617.
27. Curcio CA, Johnson M, Huang JD, Rudolf M. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *J Lipid Res*. 2010; 51:451-467.
28. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2001; 20:705-732.
29. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:14682-14687.
30. Johnson LV, 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 USA*. 2002; 99:11830-11835.
31. 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; 29:95-112.
32. Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2009; 28:1-18.
33. Williams MA, Craig D, Passmore P, Silvestri G. Retinal drusen: harbingers of age, safe havens for trouble. *Age Ageing*. 2009; 38:648-654.
34. Pauleikhoff D, Harper CA., Marshall J, Bird AC. Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. *Ophthalmology*. 1990; 97:171-178.
35. Spaide RF, Curcio CA. Drusen characterization with multimodal imaging. *Retina*. 2010; 30:1441-1454.
36. Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J. Effect of aging on foveolar choroidal circulation. *Arch Ophthalmol*. 1998; 116:150-154.
37. Stefansson E, Geirsdóttir A, Sigurdsson H. Metabolic physiology in age related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2011; 30:72-80.
38. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011; 437:169-183.

39. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27:331-371.
40. Wang H, Geisen P, Wittchen ES, King B, Burridge K, D'Amore PA, et al. The role of RPE cell-associated VEGF in choroidal endothelial cell transmigration across the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:570-578.
41. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473:298-307.
42. Schlingemann RO. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 42:91-101.
43. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, Kerkvliet S, de Jong PT. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol*. 1997; 81:154-62.
44. Inoue Y, Yanagi Y, Matsuura K, Takahashi H, Tamaki Y, Araie M. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and 2alpha in choroidal neovascular membranes associated with age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2007; 91:1720-1721.
45. Sheridan CM, Pate S, Hiscott P, Wong D, Pattwell DM, Kent D. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in human choroidal neovascular membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009; 47:1361-1367.
46. Kannan R, Zhang N, Sreekumar PG, Spee CK, Rodriguez A, Barron E, et al. Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis*. 2006; 12:1649-1659.
47. Rohrer B, Coughlin B, Kunchithapautham K, Long Q, Tomlinson S, Takahashi K, et al. The alternative pathway is required, but not alone sufficient, for retinal pathology in mouse laser-induced choroidal neovascularization. *Mol Immunol*. 2011; 48:e1-8.
48. Klein R, Davis MD, Magli YL, Segal P, Klein BE, Hubbard L. The Wisconsin age-related maculopathy grading system. *Ophthalmology*. 1991; 98:1128-1134.
49. 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*. 1995; 39:367-374.
50. The Age-Related Eye Disease Study Research Group. The age-related eye disease study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the Age-Related Eye Disease Study. Report Number 6. *Am J Ophthalmol*. 2001; 132:668-681.
51. Davis MD, Gangnon RE, Lee LY, Hubbard LD, Klein BE, Klein R, et al. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123:1484-1498.
52. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*. 2006; 113:260-266.
53. Sarks J, Arnold J, Ho IV, Sarks S, Killingsworth M. Evolution of reticular pseudodrusen. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95:979-985.
54. Coleman HR, Chan CC, Ferris FL, 3rd, Chew EY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2008; 372:1835-1845.
55. Klaver CC, Wolfs RC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol*. 1998; 116:653-658.
56. Yannuzzi LA, Sorenson J, Spaide RF, Lipson B. Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy (IPCV). *Retina*. 1990; 10:1-8.
57. Yannuzzi LA, Negro S, Iida T, Carvalho C, Rodriguez-Coleman H, Slakter J, et al. Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina*. 2001; 21:416-434.
58. Novotny HR, Alvis DL. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation*. 1961; 24:82-86.

59. Clement F, Clement A, Clement A. Angiografía con fluoresceína intravenosa. En: "Patología y cirugía de la mácula" 2010, pp.: 54-77. (Armada F y Fosneca A. eds.), Sociedad española de Oftalmología.
60. Schneider U, Gelisken F, Inhoffen W. Natural course of occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: development of classic lesions in fluorescein angiography. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005; 83:141-147.
61. Olsen TW, Feng X, Kasper TJ, Rath PP, Steuer ER. Fluorescein angiographic lesion type frequency in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2004; 111:250-255.
62. Bauml CR, Reichel E, Duker JS, Wong J, Puliafito CA. Indocyanine green hyperfluorescence associated with serous retinal pigment epithelial detachment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 1997; 104:761-769.
63. Ciardella AP, Donsoff IM, Yannuzzi LA. Polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmol Clin North Am*. 2002; 15:537-554.
64. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991; 254:1178-1181.
65. Wolf-Schnurrbusch UE, Ceklic L, Brinkmann CK, Iliev ME, Frey M, Rothenbuehler SP, et al. Macular thickness measurements in healthy eyes using six different optical coherence tomography instruments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:3432-3437.
66. Geitzenauer W, Hitzemberger CK, Schmidt-Erfurth UM. Retinal optical coherence tomography: past, present and future perspectives. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95:171-177.
67. Bressler NM. 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 therapy report 2. *Am J Ophthalmol*. 2002; 133:168-169.
68. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006; 355:1419-1431.
69. Arias L, Armada F, Donate J, Garcia-Arumi J, Giralt J, Pazos B, et al. Delay in treating age-related macular degeneration in Spain is associated with progressive vision loss. *Eye (Lond)*. 2009; 23:326-333.
70. Muether PS, Hermann MM, Koch K, Fauser S. Delay between medical indication to anti-VEGF treatment in age-related macular degeneration can result in a loss of visual acuity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011; 249:633-637.
71. McClure ME, Hart PM, Jackson AJ, Stevenson MR, Chakravarthy U. Macular degeneration: do conventional measurements of impaired visual function equate with visual disability? *Br J Ophthalmol*. 2000; 84:244-250.
72. Leat SJ, Woodhouse JM. Reading performance with low vision aids: relationship with contrast sensitivity. *Ophthalmic Physiol Opt*. 1993; 13:9-16.
73. Ladewig M, Kraus H, Foerster MH, Kellner U. Cone dysfunction in patients with late-onset cone dystrophy and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121:1557-1561.
74. Fujii GY, De Juan E Jr., Huayun MS, Sunness JS, Chang TS, Rossi JV. Characteristics of visual loss by scanning laser ophthalmoscope microperimetry in eyes with subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2003; 136:1067-1078.
75. Schuchard RA. Validity and interpretation of Amsler grid reports. *Arch Ophthalmol*. 1993; 111:776-780.
76. West SK, Rubin GS, Broman AT, Munoz B, Bandeen-Roche K, Turano K. How does visual impairment affect performance on tasks of everyday life? The SEE Project. *Salisbury Eye Evaluation*. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120:774-780.
77. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol*. 2010; 10:31-44.
78. Klein R. Race/Ethnicity and age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2011; 152:153-154.

79. Nonyane BA, 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; 51:2393-2402.
80. Jampol LM, Tielsch J. Race, macular degeneration, and the Macular Photocoagulation Study. *Arch Ophthalmol.* 1992; 110:1699-1700.
81. Katta S, Kaur I, Chakrabarti S. The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview. *J Genet.* 2009; 88:425-449.
82. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates JR, Bradley M, et al. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90:75-80.
83. Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Du N, Handa JT, Neufeld AH. Changes in retinal pigment epithelium related to cigarette smoke: possible relevance to smoking as a risk factor for age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2009; 4:e5304.
84. Bertram KM, Baglione CJ, Phipps RP, Libby RT. Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297:C1200-C1210.
85. Wong IY, Koo SC, Chan CW. Prevention of age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol.* 2011; 31:73-82.
86. Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol.* 1997; 123:199-206.
87. Smith W, Mitchell P. Family history and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1998; 26:203-206.
88. Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, Bird AC, Gilbert CE, Spector TD. Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study. *Ophthalmology.* 2002; 109:730-736.
89. 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.* 2005; 123:321-327.
90. van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PG, Pameyer JH, de Jong PT. Increased prevalence of disciform macular degeneration after cataract extraction with implantation of an intraocular lens. *Br J Ophthalmol.* 1994; 78:441-445.
91. Pollack A, Marcovich A, Bukelman A, Oliver M. Age-related macular degeneration after extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation. *Ophthalmology.* 1996; 103:1546-1554.
92. Pollack A, Bukelman A, Zalish M, Leiba H, Oliver M. The course of age-related macular degeneration following bilateral cataract surgery. *Ophthalmic Surg Lasers.* 1998; 29:286-294.
93. Wang JJ, Klein R, Smith W, Klein BE, Tomany S, Mitchell P. Cataract surgery and the 5-year incidence of late-stage age-related maculopathy: pooled findings from the Beaver Dam and Blue Mountains eye studies. *Ophthalmology.* 2003; 110:1960-1967.
94. Klein R, Klein BE, Wong TY, Tomany SC, Cruickshanks KJ. The association of cataract and cataract surgery with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120:1551-1558.
95. Cugati S, Mitchell P, Rochtchina E, Tan AG, Smith W, Wang JJ. Cataract surgery and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* 2006; 113:2020-2025.
96. Klein BE, Howard KP, Lee KE, Iyengar SK, Sivakumaran TA, Klein R. The relationship of cataract and cataract extraction to age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 2012; 119:1628-1633.
97. Freeman EE, Munoz B, West SK, Tielsch JM, Schein OD. Is there an association between cataract surgery and age-related macular degeneration? Data from three population-based studies. *Am J Ophthalmol.* 2003; 135:849-856.

98. Buch H, Nielsen NV, Vinding T, Jensen GB, Prause JU, la Cour M. 14-year incidence, progression, and visual morbidity of age-related maculopathy: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology*. 2005; 112:787-798.
99. Krishnaiah S, Das T, Nirmalan PK, Nutheti R, Shamanna BR, Rao GN, Thomas R.. Risk factors for age-related macular degeneration: findings from the Andhra Pradesh eye disease study in South India. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46: 4442–4449.
100. 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; 49:4795-4800.
101. Fraser-Bell S, Choudhury F, Klein R, Azen S, Varma R. and the Los Angeles Latino Eye Study Group. Ocular risk factors for age-related macular degeneration: the Los Angeles Latino Eye Study (LALES). *Am J Ophthalmol*. 2010; 149:735-740.
102. 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; 25:1492-1497.
103. Montes J, Erakgun T, Afrashi F, Kerici G. Incidence of cystoid macular edema after uncomplicated phacoemulsification. *Ophthalmologica*. 2003; 217:408-412.
104. Mason JO, 3rd, Albert MA, Jr., Vail R. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for refractory pseudophakic cystoid macular edema. *Retina*. 2006; 26:356-357.
105. McCarty CA, Mukesh BN, Fu CL, Mitchell P, Wang JJ, Taylor HR. Risk factors for age-related maculopathy: The Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol*. 2001; 119:1455-1462.
106. 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 no. 25. *Ophthalmology*. 2009; 116:297-303.
107. Foroughian F, Agron E, Clemons TE, Ferris FL, 3rd, Chew EY. for the AREDS Research Group. Visual acuity outcomes after cataract surgery in patients with age-related macular degeneration: Age-Related Eye Disease Study Report no. 27. *Ophthalmology*. 2009; 116:2093-2100.
108. Armbrecht AM, Findlay C, Aspinall PA, Hill AR, Dhillon B. Cataract surgery in patients with age-related macular degeneration: one-year outcomes. *J Cataract Refract Surg*. 2003; 29:686-693.
109. Sutter FK, Menghini M, Barthelmes D, Fleischhauer JC, Kurz-Levin MM, Bosch MM, et al. Is pseudophakia a risk factor for neovascular age-related macular degeneration? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48:1472-1475.
110. Baatz H, Darawsha R, Ackermann H, Scharioth GB, de Ortueta D, Pavlidis M, et al. Phacoemulsification does not induce neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:1079-1083.
111. Dong LM, Stark WJ, Jefferys JL, Al-Hazzaa S, Bressler SB, Solomon SD, et al. Progression of age-related macular degeneration after cataract surgery. *Arch Ophthalmol*. 2009; 127:1412-1419.
112. Hooper CY, Lamoureux EL, Lim L, Fraser-Bell S, Yeoh J, Harper CA, et al. Cataract surgery in high-risk age-related macular degeneration: a randomized controlled trial. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2009; 37:570-576.
113. Stone EM, Sheffield VC, Hageman GS. Molecular genetics of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2001; 10:2285-2292.
114. Majewski J, Schultz DW, Weleber RG, Schain MB, Edwards AO, Matise TC, et al. Age-related macular degeneration: a genome scan in extended families. *Am J Hum Genet*. 2003; 73:540-550.
115. 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; 73:780-790.

116. Weeks DE, Conley YP, Tsai HJ, 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; 75:174-189.
117. Kenealy SJ, Schmidt S, Agarwal A, Postel EA, De La Paz MA, Pericak-Vance MA, et al. Linkage analysis for age-related macular degeneration supports a gene on chromosome 10q26. *Mol Vis.* 2004 26; 10:57-61.
118. Iyengar SK, Song D, Klein BE, 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 ;74:20-39.
119. Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005; 308:421-424.
120. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005; 308:385-389.
- 121.. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 2005; 308:419-21.
122. 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; 16:2811-2821.
123. Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, Ripke S, Thorleifsson G, Tan PL, et al. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2011; 20:3699-2709.
124. Leveziel N, Tilleul J, Puche N, Zerbib J, Laloum F, Querques G, et al. Genetic Factors associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica.* 2011; 226:87-102.
125. Sofat R, Casas JP, Webster AR, Bird AC, Mann SS, Yates JR et al. Complement factor H genetic variant and age-related macular degeneration: effect size, modifiers and relationship to disease subtype. *Int J Epidemiol.* 2012; 41:250-262.
126. Thakkestian A, Han P, McEvoy M, Smith W, Hoh J, Magnusson K, et al. J. Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006; 15:2784-2790.
127. Donoso LA, Vrabec T, Kuivaniemi H. The role of complement Factor H in age-related macular degeneration: a review. *Surv Ophthalmol.* 2010; 55:227-246.
128. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R, Wade MS, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006; 38:1049-1054.
129. 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; 38:1055-1059.
130. Martínez-Barricarte R, Recalde S, Fernández-Robredo P, Millán I, Olavarrieta L, Viñuela A, et al. Relevance of complement factor H-related 1 (CFHR1) genotypes in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53:1087-1094.
131. Weeks DE, Conley YP, Mah TS, Paul TO, Morse L, Ngo-Chang J, et al. A full genome scan for age-related maculopathy. *Hum Mol Genet.* 2000; 9:1329-1349.
132. Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, Zarepari S, Swaroop A, Iyengar SK, et al. Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:2257-2264.
133. Clausen T, Southan C, Ehrmann M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell.* 2002; 10:443-455.
134. Grau S, Richards PJ, Kerr B, Hughes C, Caterson B, Williams AS, et al. The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J Biol Chem.* 2006; 281:6124-6129.
135. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet.* 2005; 77:389-407.

- 136.** 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;14:3227-3236.
- 137.** Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science.* 2006; 314:989-992.
- 138.** 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; 314:992-993.
- 139.** Tong Y, Liao J, Zhang Y, Zhou J, Zhang H, Mao M. LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Mol Vis.* 2010; 16:1958-81.
- 140.** Yang Z, Tong Z, Chen Y, Zeng J, Lu F, Sun X et al. Genetic and functional dissection of HTRA1 and LOC387715 in age-related macular degeneration. *PLoS Genet.* 2010; 6:e1000836.
- 141.** Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KE, 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 USA.* 2007; 104:16227-16232.
- 142.** Chowers I, Meir T, Lederman M, Goldenberg-Cohen N, Cohen Y, Banin E, et al. Sequence variants in HTRA1 and LOC387715/ARMS2 and phenotype and response to photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration in populations from Israel. *Mol Vis.* 2008; 14:2263-2271.
- 143.** Kanda A, Stambolian D, Chen W, Curcio CA, Abecasis GR, Swaroop A. Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in the human retina. *Mol Vis.* 2010; 16:1317-1323.
- 144.** Friedrich U, Myers CA, Fritsche LG, Milenkovich A, Wolf A, Corbo JC, et al. Risk- and non-risk-associated variants at the 10q26 AMD locus influence ARMS2 mRNA expression but exclude pathogenic effects due to protein deficiency. *Hum Mol Genet.* 2011; 20:1387-1399.
- 145.** 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; 40:892-896.
- 146.** 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.* 2006; 78, 852-864.
- 147.** Hadley D, Orlin A, Brown G, Brucker AJ, Ho AC, Regillo CD, et al. Analysis of six genetic risk factors highly associated with AMD in the region surrounding ARMS2 and HTRA1 on chromosome 10, region q26. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:2191-2196.
- 148.** Wang G, Spencer KL, Scott WK, Whitehead P, Court BL, Ayala-Haedo J, et al. Analysis of the indel at the ARMS2 3'UTR in age-related macular degeneration. *Hum Genet.* 2010; 127:595-602.
- 149.** Ross RJ, Bojanowski CM, Wang JJ, Chew EY, Rochtchina E, Ferris FL, 3rd, et al. The LOC387715 polymorphism and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:1128-1132.
- 150.** Shuler RK, Jr., Hauser MA, Caldwell J, Gallins P, Schmidt S, Scott WK, et al. Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Arch Ophthalmol.* 2007;125:63-67.
- 151.** Kokotas H, Grigoriadou M, Petersen MB. Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49:601-616.
- 152.** Charbel Issa P, Chong NV, Scholl HP. The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration - current evidence and translation into clinical application. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011; 249:163-174.
- 153.** 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; 51:79-88.

154. 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; 1812:12–22.
155. Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63:965-975.
156. Khandhadia S, Cipriani V, Yates JR, Lotery AJ. Age-related macular degeneration and the complement system. *Immunobiology*. 2012; 217:127-146.
157. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 632:71-79.
158. 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; 285:30192-30202.
159. Rodríguez de Córdoba S, Goicoechea de Jorge E. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol*. 2008; 151: 1–13.
160. Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, et al. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics*. 2004; 56:77-82.
161. Okemefuna AI, Nan R, Miller A, Gor J, Perkins SJ. Complement factor H binds at two independent sites to C-reactive protein in acute phase concentrations. *J Biol Chem*. 2010; 285:1053-1065.
162. Wu J, Wu YQ, Ricklin D, Janssen BJ, Lambris JD, Gros P. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol*. 2009; 10:728-733.
163. Ormsby RJ, Ranganathan S, Tong JC, Griggs KM, Dimasi DP, Hewitt AW, et al. Functional and structural implications of the complement factor H Y402H polymorphism associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Visual Sci*. 2008; 49:1763-1770.
164. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, 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 USA*. 2005; 102:7227-7232.
165. Verdugo ME, Ray J. Age-related increase in activity of specific lysosomal enzymes in the human retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*. 1997; 65:231-240.
166. Hakobyan S, Harris CL, van den Berg CW, Fernandez-Alonso MC, de Jorge EG, Rodríguez de Córdoba SR, et al. Complement factor H binds to denatured rather than to native pentameric C-reactive protein. *J Biol Chem*. 2008; 283:30451-3060.
167. Howes KA, Liu Y, Dunaief JL, Milam A, Frederick JM, Marks A, et al. Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45:3713-3720.
168. Lau LI, Liu CJ, Wei YH. Increase of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in aqueous humor of patients with exudative age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:5486-5490.
169. Wang G, Spencer KL, Court BL, Olson LM, Scott WK, Haines JL, et al. Localization of age-related macular degeneration-associated ARMS2 in cytosol, not mitochondria. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:3084-3090.
170. 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;351:346-353.
171. Xu YT, Wang Y, Chen P, Xu HF. Age-related maculopathy susceptibility 2 participates in the phagocytosis functions of the retinal pigment epithelium. *Int J Ophthalmol*. 2012; 5:125-132.
172. Querques G, Avellis FO, Querques L, Bandello F, Souied EH. Age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2011; 5:593-601.
173. Yehoshua Z, Rosenfeld PJ, Albini TA. Current clinical trials in dry AMD and the definition of appropriate clinical outcome measures. *Semin Ophthalmol*. 2011; 26:167-180.
174. Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR, et al. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology*. 2004; 111:1280-1287.

175. Evans JR, Fletcher AE, Wormald RP. 28,000 Cases of age related macular degeneration causing visual loss in people aged 75 years and above in the United Kingdom may be attributable to smoking. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89:550-553.
176. Mares JA, Volland RP, Sondel SA, Millen AE, Larowe T, Moeller SM, et al. Healthy lifestyles related to subsequent prevalence of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2011; 129:470-480.
177. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Role of free radicals and antioxidant signaling in skeletal muscle health and pathology. *Infect Disord Drug Targets*. 2009; 9:428-444.
178. Tomaszewski M, Charchar FJ, Przybycin M, Crawford L, Wallace AM, Gosek K, et al. Strikingly low circulating CRP concentrations in ultramarathon runners independent of markers of adiposity: how low can you go? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1640-1644.
179. The Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001; 119:1417-1436.
180. van Leeuwen R, Boekhoorn S, Vingerling JR, Witteman JC, Klaver CC, Hofman A, et al. Dietary intake of antioxidants and risk of age-related macular degeneration. *JAMA*. 2005; 294:3101-3107.
181. Evans JR, Lawrenson JG. Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; 6:CD000253.
182. Krishnadev N, Meleth AD, Chew EY. Nutritional supplements for age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010; 21: 184-189.
183. Olson JH, Erie JC, Bakri SJ. Nutritional supplementation and age-related macular degeneration. *Semin Ophthalmol*. 2011; 26:131-136.
184. The AREDS2 Research Group. The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2): study design and baseline characteristics (AREDS2 Report Number 1). *Ophthalmology*. 2012 Jul 26. (on line).
185. Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Knudtson MD. Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122:750-757.
186. Macular Photocoagulation Study Group. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol*. 1986; 104:694-701.
187. 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*. 2001; 119, 198-207.
188. Bessler NM. Verteporfin therapy in age-related macular degeneration (VAM): an open-label multicenter photodynamic therapy study of 4,435 patients. *Retina*. 2004; 24:512-520.
189. Donate J. Terapia fotodinámica en la degeneración macular asociada a la edad. En: "Patología y cirugía de la mácula" 2010, pp.: 655-660. (Armada F y Fosneca A. eds.), Sociedad española de Oftalmología.
190. Verteporfin Roundtable 2000 and 2001 Participants. Guidelines for using verteporfin (visudyne) in photodynamic therapy to treat choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration and other causes. *Retina*. 2002; 22:6-18.
191. Verteporfin Roundtable Participants. Guidelines for using verteporfin (Visudyne) in photodynamic therapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration and other causes: update. *Retina*. 2005; 25:119-134.
192. Skaf AR, Mahmoud T. Surgical treatment of age-related macular degeneration. *Semin Ophthalmol*. 2011; 26:181-191.
193. Hawkins BS, Bressler NM, Miskala PH, Bressler SB, Holekamp NM, Marsh MJ, et al. Surgery for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no. 11. *Ophthalmology*. 2004; 111:1967-1980.
194. Romano MR, Valldeperas X, Vinciguerra P, Wong D. Sub-macular surgery: is still an option for age-related macular degeneration? *Curr Drug Targets*. 2011; 12:190-198.

195. Fujii GY, Au Eong KG, Humayun MS, de Juan E, Jr. Limited macular translocation: current concepts. *Ophthalmol Clin North Am.* 2002; 15:425-436.
196. Fujii GY, Pieramici DJ, Humayun MS, Schachat AP, Reynolds SM, Melia M, et al. Complications associated with limited macular translocation. *Am J Ophthalmol.* 2000; 130:751-762.
197. Falkner-Radler CI, Krebs I, Glittenberg C, Povazay B, Drexler W, Graf A, et al. Human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation: outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomised clinical study. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95:370-375.
198. van Zeeburg EJ, Maaijwee KJ, Missotten TO, Heimann H, van Meurs JC. A Free Retinal Pigment Epithelium-Choroid Graft in Patients With Exudative Age-Related Macular Degeneration: Results up to 7 Years. *Am J Ophthalmol.* 2012; 153:120-127.
199. Brown GC, Brown MM, Lieske HB, Lieske PA, Brown KS, Lane SS. Comparative effectiveness and cost-effectiveness of the implantable miniature telescope. *Ophthalmology.* 2011; 118:1834-1843.
200. Chader GJ, Weiland J, Humayun MS. Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis. *Prog Brain Res.* 2009; 175:317-332.
201. Magdelaine-Beuzelin C, Pinault C, Paintaud G, Watier H. Therapeutic antibodies in ophthalmology: old is new again. *MAbs.* 2010; 2:176-180.
202. Sivaprasad S. Role of pegaptanib sodium in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol.* 2008; 2:339-346.
203. Gonzales CR; VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (VISION) Clinical Trial Group. Enhanced efficacy associated with early treatment of neovascular age-related macular degeneration with pegaptanib sodium: an exploratory analysis. *Retina.* 2005; 25:815-827.
204. Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, Thomsen K, Berleau L, Licko V, et al. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol.* 1999; 27:536-544.
205. Jackson TL, Antcliff RJ, Hillenkamp J, Marshall J. Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:2141-2146.
206. 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; 26:859-870.
207. Sassa Y, Hata Y. Antiangiogenic drugs in the management of ocular diseases: Focus on anti-vascular endothelial growth factor. *Clin Ophthalmol.* 2010; 4:275-283.
208. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2006; 113:363-372.
209. CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Ying GS, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ. The Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2011; 364:1897-1908.
210. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, Grunwald JE, Toth C, Redford M, Ferris FL 3rd. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology.* 2012; 119:1388-1398.
211. Abouammoh M, Sharma S. Ranibizumab versus bevacizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* 2011; 22:152-158.
212. Browning DJ, Kaiser PK, Rosenfeld PJ, Stewart MW. Aflibercept for age-related macular degeneration: a game-changer or quiet addition? *Am J Ophthalmol.* 2012; 154:222-226.
213. Stewart MW. Clinical and differential utility of VEGF inhibitors in wet age-related macular degeneration: focus on aflibercept. *Clin Ophthalmol.* 2012; 6:1175-1186.
214. Kirwan JF, Constable PH, Murdoch IE, Khaw PT. Beta irradiation: new uses for an old treatment: a review. *Eye (Lond).* 2003; 17:207-215.

215. Petrarca R, Jackson TL. Radiation therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2011; 5:57-63.
216. Evans JR, Sivagnanavel V, Chong V. Radiotherapy for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 5:CD004004.
217. Chakravarthy U, MacKenzie G. External beam radiotherapy in exudative age-related macular degeneration: a pooled analysis of phase I data. *Br J Radiol*. 2000; 73:305-313.
218. Avila MP, Farah ME, Santos A, Duprat JP, Woodward BW, Nau J. Twelve-month short-term safety and visual-acuity results from a multicentre prospective study of epiretinal strontium-90 brachytherapy with bevacizumab for the treatment of subfoveal choroidal neovascularisation secondary to age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93:305-309.
219. Ávila MP, Farah ME, Santos A, Carla L, Fuji G, Rossi J, Nau J. Three-year safety and visual acuity results of epimacular 90strontium/90yttrium brachytherapy with bevacizumab for the treatment of subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina*. 2012; 32:10-18.
220. Dugel PU, Petrarca R, Bennett M, Barak A, Weinberger D, Nau J, et al. Macular epiretinal brachytherapy in treated age-related macular degeneration: MERITAGE study: twelve-month safety and efficacy results. *Ophthalmology*. 2012; 119:1425-1431.
221. Moshfeghi DM, Kaiser PK, Gertner M. Stereotactic low-voltage x-ray irradiation for age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95:185-188.
222. Canton VM, Quiroz-Mercado H, Velez-Montoya R, Lopez-Miranda MJ, Moshfeghi AA, Shusterman EM, et al. 24-Gy low-voltage X-ray Irradiation with ranibizumab therapy for neovascular AMD: 6-month safety and functional outcomes. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2012; 43:20-24.
223. Couch SM, Bakri SJ. Review of combination therapies for neovascular age-related macular degeneration. *Semin Ophthalmol*. 2011; 26:114-120.
224. 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; 355:1432-1444.
225. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T; ANCHOR Study Group*. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009; 116:57-65.
226. 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*. 2008; 145:239-248.
227. Schmidt-Erfurth U, Eldem B, Guymer R, Korobelnik JF, Schlingemann RO, Axer-Siegel R, et al. Efficacy and safety of monthly versus quarterly ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration: the EXCITE study. *Ophthalmology*. 2011; 118:831-839.
228. 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*. 2007; 143:566-583.
229. Lalwani GA, Rosenfeld PJ, Fung AE, Dubovy SR, Michels S, Feuer W, et al. A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study. *Am J Ophthalmol*. 2009; 148:43-58.
230. Hernandez-Pastor LJ, Ortega A, Garcia-Layana A, Giraldez J. Cost-effectiveness of ranibizumab compared with pegaptanib in neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010; 248:467-476.
231. Boyer DS, Heier JS, Brown DM, Francom SF, Ianchulev T, Rubio RG. A Phase IIIb study to evaluate the safety of ranibizumab in subjects with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2009; 116:1731-1739.

232. Sadda SR. HORIZON extension trial of ranibizumab [LUCENTIS®] for neovascular age-related macular degeneration [AMD]: first-year safety and efficacy results. Retina Society Annual Meeting. Scottsdale, USA, 2008.
233. 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*. 2011; 118:663-671.
234. Spaide R. Ranibizumab according to need: a treatment for age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2007; 143:679-680.
235. Gupta OP, Shienbaum G, Patel AH, Fecarotta C, Kaiser RS, Regillo CD. A treat and extend regimen using ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration clinical and economic impact. *Ophthalmology*. 2010; 117:2134-2140.
236. Engelbert M, Zweifel SA, Freund KB. Long-term follow-up for type 1 (subretinal pigment epithelium) neovascularization using a modified "treat and extend" dosing regimen of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Retina*. 2010; 30:1368-1375.
237. Oubraham H, Cohen SY, Samimi S, Marotte D, Bouzaher I, Bonicel P, et al. Inject and extend dosing versus dosing as needed: a comparative retrospective study of ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Retina*. 2011; 31:26-30.
238. Pauleikhoff D, Kirchhof B. Retreatment criteria in anti-VEGF therapy of exudative AMD: critical analysis of present regimes and new morphological definition of "lesion activity". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011; 249:631-632.
239. Day S, Acquah K, Mruthyunjaya P, Grossman DS, Lee PP, Sloan FA. Ocular complications after anti-vascular endothelial growth factor therapy in Medicare patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2011; 152:266-272.
240. Holz FG, Korobelnik JF, Lanzetta P, Mitchell P, Schmidt-Erfurth U, Wolf S, et al. The effects of a flexible visual acuity-driven ranibizumab treatment regimen in age-related macular degeneration: outcomes of a drug and disease model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:405-412.
241. Seitsonen SP, Jarvela IE, Meri S, Tommila PV, 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; 17:943-949.
242. Goverdhan SV, Hannan S, Newsom RB, Luff AJ, Griffiths H, Lotery AJ. An analysis of the CFH Y402H genotype in AMD patients and controls from the UK, and response to PDT treatment. *Eye (Lond)*. 2008; 22:849-854.
243. Brantley MA, Jr., Edelstein SL, King JM, Plotzke MR, Apte RS, Kymes SM, et al. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. *Eye (Lond)*. 2009; 23:626-631.
244. Chowers I, Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Vicuña-Kojchen J, Litchinger A, Weinstein O, et al. Association of complement factor H Y402H polymorphism with phenotype of neovascular age related macular degeneration in Israel. *Mol Vis*. 2008; 14:1829-1834.
245. Feng X, Xiao J, Longville B, Tan AX, Wu XN, Cooper MN, et al. Complement factor H Y402H and C-reactive protein polymorphism and photodynamic therapy response in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2009; 116:1908-1912.
246. Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Takita H, et al. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2011; 118:93-100.
247. Bessho H, Honda S, Kondo N, Negi A. The association of age-related maculopathy susceptibility 2 polymorphisms with phenotype in typical neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Mol Vis*. 2011; 17:977-982.

248. Chowers I, Meir T, Lederman M, Goldenberg-Cohen N, Cohen Y, Banin E, et al. Sequence variants in HTRA1 and LOC387715/ARMS2 and phenotype and response to photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration in populations from Israel. *Mol Vis*. 2008; 14:2263-2271.
249. Brantley MA, Jr., 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; 114:2168-2173.
250. 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; 89:344-349.
251. Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA, Jr. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93:610-613.
252. 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; 32:4-9.
253. 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*. 2011; 96:208-212.
254. 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; 16:2598-2604.
255. 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; 52:4694-4702.
256. Maheshwary AS, Oster SF, Yuson RM, Cheng L, Mojana F, Freeman WR. The association between percent disruption of the photoreceptor inner segment-outer segment junction and visual acuity in diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol*. 2010; 150:63-67.
257. Gómez-Ulla F, Basauri E, Arias L, Martínez-Sanz F. Manejo de las inyecciones intravítreas. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2009; 84:377-388.
258. Brantley MA, Jr., Edelstein SL, King JM, Apte RS, Kymes SM, Shiels A. Clinical phenotypes associated with the complement factor H Y402H variant in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2007; 144:404-408.
259. Pulido JS, McConnell JP, Lennon RJ, Bryant SC, Peterson LM, Berger PB, et al. Relationship between age-related macular degeneration-associated variants of complement factor H and LOC387715 with coronary artery disease. *Mayo Clin Proc*. 2007; 82:301-307.
260. Bland J.G. Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986; 1:307-310.
261. Menke MN, Dabov S, Knecht P, Sturm V. Reproducibility of retinal thickness measurements in healthy subjects using Spectralis optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 2009; 147:467-472.
262. Wenner Y, Wismann S, Jäger M, Pons-Kühnemann J, Lorenz B. Interchangeability of macular thickness measurements between different volumetric protocols of Spectralis optical coherence tomography in normal eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011; 249:1137-1145.
263. Fleiss JL. The design and analysis of clinical experiments. Wiley; New York. 1986.
264. Krebs I, Smretschnig E, Moussa E, Brannath W, Womastek I, Binder S. Quality and reproducibility of retinal thickness measurements in two spectral-domain optical coherence tomography machines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:6925-6933.

265. Patel PJ, Chen FK, Ikeji F, Xing W, Bunce C, Da Cruz L, et al. Repeatability of Stratus optical coherence tomography measures in neovascular age related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:1084-1088.
266. Parravano M, Oddone F, Boccassini B, Menchini F, Chiaravalloti A, Schiavone M, et al. Reproducibility of macular thickness measurements using Cirrus spectral domain optical coherence tomography in neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:4788-4791.
267. Krebs I, Hagen S, Brannath W, Haas P, Womastek I, de Salvo G, et al. Repeatability and reproducibility of retinal thickness measurements by optical coherence tomography in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2010; 117:1577-1584.
268. Menke MN, Dabov S, Knecht P, Sturm V. Reproducibility of retinal thickness measurements in patients with age-related macular degeneration using 3D Fourier-domain optical coherence tomography (OCT)(Topcon 3D-OCT 1000). *Acta Ophthalmol*. 2011; 89:346-351.
269. Puy P, Otero M, Benítez JM, García-Sánchez J. Determinación de la concentración de proteínas en el humor acuoso mediante el láser Flaremeter FM-500 después de la cirugía de catarata. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 1995; 68:217-222.
270. Vizzeri G, Bowd Ch, Medeiros F, Weinreb R, Zangwill L. Effect of signal strength and improper alignment on the variability of Stratus optical coherence tomography retinal nerve fiber layer thickness measurements. *Am J Ophthalmol*. 2009; 148: 249-255.
271. Cheung CY, Leung CK, Lin D, Pang CP, Lam DS. Relationship between retinal nerve fiber layer measurement and signal strength in optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2008; 115:1347-1351.
272. Furino C, Ferrara A, Cardascia N, Besozzi G, Alessio G, Sborgia L, et al. Combined cataract extraction and intravitreal bevacizumab in eyes with choroidal neovascularization resulting from age-related macular degeneration. *J Cataract Refract Surg*. 2009; 35:1518-1522.
273. Rosenfeld PJ, Shapiro H, Ehrlich JS, Wong P; MARINA and ANCHOR Study Groups. Cataract surgery in ranibizumab-treated patients with neovascular age-related macular degeneration from the phase 3 ANCHOR and MARINA trials. *Am J Ophthalmol*. 2011; 152:793-798.
274. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetología*. 2012; 55:88-93.
275. de la Fuente M, Blanco MJ, Pazos B, Fernández MI, Carracedo A, Sánchez-Salorio et al. Complement factor H. *Ophthalmology*. 2007; 114:193.e1-2.
276. Recalde S, Fernandez-Robredo P, Altarriba M, Salinas-Alaman A, García-Layana A. Age-related macular degeneration genetics. *Ophthalmology*. 2008; 115:916-916.
277. García Layana A, Zarranz-Ventura J, Fernández Robredo P, Recalde S, Rodríguez de Córdoba S; Grupo Español de Investigación Cooperativa en DMAE. Genetics and ARMD: from the laboratory to the consulting room. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2011; 86:101-102.
278. Brion M, Sanchez-Salorio M, Corton M, de la Fuente M, Pazos B, Othman M, et al. Genetic association study of age-related macular degeneration in the Spanish population. *Acta Ophthalmol*. 2011; 89:12-22.
279. Cruz-Gonzalez F, Lorenzo-Pérez R, Cañete-Campos C, Hernández-Galilea E, González-Sarmiento R. Influencia de haplotipos de polimorfismos de CFH, HTRA1 y ARMS2 en la aparición de degeneración macular asociada a la edad. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2012, en prensa. (10.1016/j.oftal.2012.04.019)
280. Tanaka K, Nakayama T, Yuzawa M, Wang Z, Kawamura A, Mori R, et al. Analysis of candidate genes for age-related macular degeneration subtypes in the Japanese population. *Mol Vis*. 2011; 17:2751-2758.
281. Sobrin L, Reynolds R, Yu Y, Fagerness J, Leveziel N, Bernstein PS, et al. ARMS2/HTRA1 locus can confer differential susceptibility to the advanced subtypes of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2011; 151:345-352.
282. Leveziel N, Puche N, Richard F, Somner JE, Zerbib J, Bastuji-Garin S, et al. Genotypic influences on severity of exudative age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:2620-2625.

- 283.** Gu J, Pauer GJ, Yue X, Narendra U, Sturgill GM, Bena J, et al. Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with proteomic and genomic biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8:1338-1349.
- 284.** Arias L, Roman I, Masuet-Aumatell C, Rubio MJ, Caminal JM, Catala J, ET al. One-year results of a flexible regimen with ranibizumab therapy in macular degeneration. Relationship with the number of injections. *Retina*. 2011; 31:1261-1267.
- 285.** Muriel MA, Fatela B, Valdivia A, Clement F. Tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad exudativa con ranibizumab en la práctica clínica. Resultados y factores pronósticos. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2011; 86:254-259.
- 286.** Reche J. Evaluación de la eficacia y seguridad de una pauta flexible, guiada por tomografía de coherencia óptica (OCT) de ranibizumab (Lucentis®) en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) exudativa. Tesis Doctoral. 2012. Universidad Complutense.
- 287.** Rosenfeld PJ, Shapiro H, Tuoni L, Webster M, Elledge J, Blodi B, and the MARINA and ANCHOR Study Groups. Characteristics of patients losing vision after 2 years of monthly dosing in the phase III ranibizumab clinical trials. *Ophthalmology*. 2011; 118:523-530.
- 288.** Saint-Geniez M, Kurihara T, Sekiyama E, Maldonado AE, D'Amore PA. An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:18751-18756.
- 289.** Ford KM, Saint-Geniez M, Walshe T, Zahr A, D'Amore PA. Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:9478-9487.
- 290.** Byeon SH, Lee SC, Choi SH, Lee HK, Lee JH, Chu YK, et al. Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:1190-1197.
- 291.** Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, Kurihara T, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on Müller cells and photoreceptors. *PLoS One*. 2008; 3:e3554.
- 292.** Klettner A, Möhle F, Roider J. Intracellular bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010; 248:819-824.
- 293.** Spitzer MS, Yoeruek E, Sierra A, Wallenfels-Thilo B, Schraermeyer U, Spitzer B, et al. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis®) on different ocular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007; 245:1837-1842.
- 294.** Carneiro A, Falcão M, Pirraco A, Milheiro-Oliveira P, Falcão-Reis F, Soares. Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2009; 88:522-527.
- 295.** Martinez-de-la-Casa JM, Ruiz-Calvo A, Saenz-Frances F, Reche-Frutos J, Calvo-Gonzalez C, Donate-Lopez J, Garcia-Feijoo J. Retinal nerve fiber layer thickness changes in patients with age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53:6214-6218.
- 296.** Stewart MW, Rosenfeld PJ, Penha FM, Wang F, Yehoshua Z, Bueno-Lopez E, et al. Pharmacokinetic rationale for dosing every 2 weeks versus 4 weeks with intravitreal ranibizumab, bevacizumab, and aflibercept (vascular endothelial growth factor Trap-eye). *Retina*. 2012; 32:434-457.
- 297.** Krohne TU, Liu Z, Holz FG, Meyer CH. Intraocular pharmacokinetics of ranibizumab following a single intravitreal injection in humans. *Am J Ophthalmol*. 2012; 154:682-686.
- 298.** Hörster R, Ristau T, Sadda SR, Liakopoulos S. Individual recurrence intervals after anti-VEGF therapy for age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011; 249:645-652.
- 299.** Yamashiro K, Tomita K, Tsujikawa A, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, et al. Factors associated with the response of age-related macular degeneration to intravitreal ranibizumab treatment. *Am J Ophthalmol*. 2012; 154:125-136.
- 300.** Vierkotten S, Muether PS, Fauser S. Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components. *PLoS One*. 2011; 6:e22959.

301. Jones A, Kumar S, Zhang N, Tong Z, Yang JH, Watt C, et al. Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:14578-14583.
302. Tran TH, Querques G, Forzy G, Souied EH. Angiographic regression patterns after intravitreal ranibizumab injections for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2011; 42:498-508.
303. Querques G, Tran TH, Forte R, Querques L, Bandello F, Souied EH. Anatomic response of occult choroidal neovascularization to intravitreal ranibizumab: a study by indocyanine green angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012; 250:479-484.
304. Omri S, Omri B, Savoldelli M, Jonet L, Thillaye-Goldenberg B, Thuret G, et al. The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. *Clin Ophthalmol*. 2010; 4:183-195.
305. Li Y, Tao W, Luo L, Huang D, Kauper K, Stabila P, et al. CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One*. 2010; 5:e9495.
306. Hayashi H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Ota M, Otani A, Yoshimura N. Association between foveal photoreceptor integrity and visual outcome in neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2009; 148:83-89.
307. Oishi A, Hata M, Shimozone M, Mandai M, Nishida A, Kurimoto Y. The significance of external limiting membrane status for visual acuity in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2010; 150:27-32.
308. Sayanagi K, Sharma S, Kaiser PK. Photoreceptor status after anti-vascular endothelial growth factor therapy in exudative age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93:622-626.
309. Shin HJ, Chung H, Kim HC. Association between foveal microstructure and visual outcome in age-related macular degeneration. *Retina*. 2011; 31:1627-1636.
310. Landa G, Su E, Garcia PM, Seiple WH, Rosen RB. Inner segment-outer segment junctional layer integrity and corresponding retinal sensitivity in dry and wet forms of age-related macular degeneration. *Retina*. 2011; 31:364-370.
311. Gamulescu MA, Panagakis G, Theek C, Helbig H. Predictive factors in OCT analysis for visual outcome in exudative AMD. *J Ophthalmol*. 2012; 2012:851648.
312. Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Oishi A, Ooto S, Yamashiro K, Tamura H, et al. Relationship between retinal morphological findings and visual function in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012; 250:1129-1136.
313. Oishi A, Shimozone M, Mandai M, Hata M, Nishida A, Kurimoto Y. Recovery of photoreceptor outer segments after anti-VEGF therapy for age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012. DOI 10.1007/s00417-012-2034-4.

ANEXOS

Aprobación del estudio E1 por el Comité de Ética e Investigación Clínica de Hospital Clínico San Carlos

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
Hospital Clínico San Carlos
Área 7 -Madrid-

Telf. 91.330 38 19/ Fax. 91.330 32 99
e.mail: ceic.hcsc@salud.madrid.org

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

DÑA M^a DEL MAR GARCÍA ARENILLAS, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID.

HACE CONSTAR:

Que el proyecto de investigación titulado "*Incidencia de neovascularización coroidea tras cirugía de cataratas*", con código interno nº E-09/318, del que es Investigador Principal, el Dr. Julián García Feijoo, del Departamento de Oftalmología del Hospital Clínico San Carlos, ha sido estudiado por este Comité, no habiéndose realizado objeción alguna al mismo.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto.

Madrid, 23 de Septiembre de 2009



Fdo: Dra. Mar García Arenillas

Aprobación de los estudios E2 y E3 por el Comité de Ética



Informe Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica

C.P. DMAE-LOC/CFH - C.I. 11/046-E

08 de marzo de 2011

CEIC Area 7 - Hospital Clínico San Carlos

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Dra. Mar García Arenillas
Secretaria del CEIC Area 7 - Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado "**Influencia de la genética en el desarrollo de la degeneración exudativa macular asociada a la edad y en su respuesta al tratamiento**" con código interno nº 11/046-E del que es Investigador Principal el **Dr. Juan Donate López** del Servicio de Oftalmología, del Hospital Clínico San Carlos, ha sido estudiado por este Comité, no habiéndose realizado objeción alguna al mismo.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto.

Lo que firmo en Madrid, a 08 de marzo de 2011

Fdo: Dra. Mar García Arenillas
Secretaria del CEIC - Hospital Clínico San Carlos

Consentimiento informado para el estudio E1



Hospital Clínico San Carlos
Servicio de Oftalmología

Estudio Clínico: Incidencia de neovascularización coroidea tras cirugía de cataratas.

INFORMACION PARA EL PACIENTE.

Estimado Paciente:

Este folleto le facilitará información importante acerca de este estudio. Le pedimos que lea detenidamente la información y que pregunte a su médico si hay algo que no está claro o si tiene alguna pregunta.

Se le propone participar en un estudio promovido por el Servicio de Oftalmología del HCSC.

Introducción.

Se denomina cataratas a la pérdida de transparencia del cristalino. Cuando existe una pérdida de agudeza visual suficiente debida a cataratas, la cirugía es la única manera de recuperar visión. La técnica habitual consiste en la retirada de la catarata e implantación, a través de unas pequeñas incisiones, de una lente intraocular de un material sintético.

Por otro lado, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad que se caracteriza por la aparición de alteraciones degenerativas progresivas en la retina del área macular, zona de máxima visión. La entrada en el estudio NO implica que tenga usted degeneración macular en este momento. Una de las formas de DMAE es la exudativa o neovascular y la otra es la atrófica o seca. El Objetivo del presente estudio es evaluar la incidencia de neovascularización coroidea tras la cirugía de catarata a corto plazo.

Un oftalmólogo examinará sus ojos y determinará si usted puede participar en el Estudio. Este examen consta de una evaluación completa del estado de sus ojos. Si usted reúne las condiciones necesarias para participar en el Estudio podrá ser incluido. Si es así se le realizarán unos estudios no invasivos (fotografía del fondo de ojo bajo dilatación y tomografía de coherencia óptica) unos días antes de su cirugía de catarata, y después, al mes, a los 6 meses y a los 12 meses de haberse intervenido.

Tras la cirugía deberá seguir una pauta de revisiones para controlar la evolución postoperatoria, igual que lo haría un paciente que no fuese incluido en este estudio.

Posibles riesgos y molestias.

Las pruebas mencionadas no conllevan riesgos inherentes a su realización. Son pruebas de no contacto con los ojos, con lo que no suponen molestias ni transmiten posibles infecciones. Sólo requieren fijar la mirada tiempos inferiores a un minuto. No se le realizará ningún procedimiento quirúrgico adicional a la cirugía de la catarata indicada en su caso.

Beneficios.

Uno de los beneficios al participar en este Estudio, es contribuir al entendimiento más amplio de la relación entre cirugía de catarata y desarrollo posterior de degeneración macular o aceleración en un proceso ya conocido, que permitan optimizar el momento de indicación de la intervención quirúrgica de catarata y minimizar las posibles repercusiones de ésta sobre la historia natural de la DMAE. Por otro lado, al tener pautadas revisiones aunque esté usted asintomático, caso de que apareciera una neovascularización coroidea subclínica, el diagnóstico sería más precoz, y por tanto, mejor sería el pronóstico con tratamiento.

Condiciones de Participación-

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria y puede negarse a participar o puede retirarse de este estudio en cualquier momento sin tener que dar razón alguna por ello. En cualquier momento durante el estudio, si se detecta cualquier daño o su médico opina que necesita tratamiento médico o que debe retirarse del estudio se le informará debidamente y se procederá en el sentido más adecuado para su diagnóstico y tratamiento.

Aunque los datos serán almacenados y analizados por ordenador, se mantendrá una estricta confidencialidad en todo momento y su historial será anónimo de acuerdo con la Ley 15/99 de Protección de datos de carácter personal. En caso de publicarse los resultados de este estudio, no se utilizará su nombre o sus datos personales.

Coordinador o Intermediario.

En caso de surgir algún interrogante acerca de esta investigación, su participación, o si ha sufrido un daño como consecuencia de este estudio, por favor sírvase contactar con los investigadores.

Juan Donate , Cristina Calvo González, Juan Reche. Frutos, Alicia Valverde Megías.

Al número de teléfono 91.330.39.49. (Departamento de AFG)



Hospital Clínico San Carlos



Hospital Clínico San Carlos

Servicio de Oftalmología

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Titulo del estudio: Incidencia de neovascularización coroidea tras cirugía de cataratas

Yo _____
(nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado, he podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con: _____
(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Firma del participante:

Firma del Investigador:

Fecha: ___/___/___

Fecha: ___/___/___

Consentimiento informado para los estudios E2 y E3



Hospital Clínico San Carlos



SERVICIO DE OFTALMOLOGÍA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN
EN EL ESTUDIO “INFLUENCIA DE LA GENÉTICA EN EL
DESARROLLO DE LA DEGENERACIÓN EXUDATIVA
MACULAR ASOCIADA A LA EDAD Y EN SU RESPUESTA AL
TRATAMIENTO”

El paciente D./ Dña _____
o en su representación D./
Dña _____ manifiesto que he sido
informado por el Dr _____ de los siguientes
aspectos:

*Información general:

Los estudios más recientes avalan que existe mayor prevalencia de degeneración macular asociada a la edad en individuos con determinados genes. Además, parece que los tratamientos que existen para esta patología son menos efectivos cuando estos genes están presentes. El presente estudio trata de averiguar la frecuencia de estos genes en pacientes con degeneración macular y en población sana y de relacionar la evolución de los pacientes con sus genes. Los genes son las unidades que portan la información que se transmiten de padres a hijos. Para cada gen pueden existir distintas posibilidades combinadas en pares y se puede conocer las variantes para cada gen y persona concreta. Usted pertenece al grupo de sujetos.....

*Procedimiento:

La caracterización del DNA se puede realizar a partir de una pequeña muestra de sangre venosa periférica. NO se inyectará ninguna sustancia adicional, sólo se extraerá la muestra de sangre. Sólo se hará esta extracción el día fijado.

La extracción de sangre NO MODIFICARÁ en modo alguno el tratamiento que mi patología requiere, en caso de tener degeneración macular, ni supondrá más pruebas en el caso de no tener patología macular.

Facilitar la comprensión de los factores de riesgo de la degeneración macular asociada a la edad para poder, en un futuro, personalizar el seguimiento y el tratamiento, optimizando los resultados y minimizando los riesgos derivados del tratamiento.

***Riesgos:**

a) Hematoma en el punto de inyección. No superior al riesgo derivado de un análisis normal de sangre rutinario.

b) Otros riesgos: infección en el punto de inyección, etc.

***Alternativas:**

La participación en el presente estudio es voluntaria y puede revocarse este consentimiento cuando desee. También es posible ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición mediante escrito dirigido al Hospital Clínico San Carlos (Servicio de Oftalmología, Profesor Martín Lagos s/n, 28040, Madrid).

***Confidencialidad:**

La información derivada del procesamiento de la muestra será tratada con la máxima confidencialidad, según la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de Datos de Carácter Personal. Yo, como paciente que se incorpora al presente estudio, consiento la inclusión de mis datos en mi historia clínica, así como los datos resultantes de mi participación, en un Fichero de Investigación Clínica cuyo responsable será el Hospital Clínico San Carlos (Servicio Madrileño de Salud) y cuya finalidad es la de llevar a cabo la realización de estudios de investigación.

DECLARO:

Haber recibido información verbal clara y sencilla sobre el estudio y el procedimiento que se va a realizar. Mis dudas han sido convenientemente aclaradas. Por ello, doy mi consentimiento para participar en el presente estudio.

Firma del paciente:

Firma del médico:

Fdo: _____

Fdo: _____

Fecha: _____

Fecha: _____

Consentimiento informado para la realización de angiografías



Hospital Clínico San Carlos



Comunidad de Madrid

SERVICIO DE OFTALMOLOGÍA
**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DE ANGIOGRAFIAS CON FLUORESCENCIA
 Y/O VERDE DE INDOCIANINA**

El paciente D./Dña _____
 o en su representación D./Dña _____
 manifiesto que he sido informado/a por el Dr./a _____
 de los siguientes aspectos:

*** Procedimiento:**

La angiografía es una técnica exclusivamente diagnóstica encaminada al estudio de los vasos retinianos y membranas oculares (retina y coroides).

La técnica consiste en la administración por vía intravenosa de 3cc de fluoresceína para ver y fotografiar su paso por los vasos del ojo. En ocasiones, es necesario, para el estudio completo de la enfermedad, el uso de otro contraste con COMPONENTES YODADOS (verde de indocianina). La inyección del contraste se hace habitualmente en las venas superficiales del brazo, el antebrazo o la mano.

*** Alternativas:**

En mi caso particular, se ha considerado que ésta es la prueba más adecuada, pero existen otras alternativas, de cuyos beneficios y riesgos he sido satisfactoriamente informado.

*** Riesgos:**

Los riesgos y complicaciones más relevantes que pueden presentarse son:

a).- Riesgos Generales:

En la mayoría de los casos, la inyección del contraste sólo produce la molestia de la punción, aunque a veces pueden aparecer efectos desagradables como sensación de calor, mal sabor de boca, náuseas, vómitos, picores o erupción en la piel. En otras ocasiones, el contraste puede salirse de la vena produciendo hinchazón y molestias locales. Estas reacciones generalmente no necesitan tratamiento o bien se corrigen fácilmente con medicación adecuada.

El verde de indocianina se elimina por la bilis, tiñéndola de una coloración verdusca. La fluorescencia se elimina por el riñón, provocando una tinción amarillenta de la orina durante 24-36 horas. Asimismo, la fluoresceína puede colorear la piel de amarillo desde escasas horas hasta su completa eliminación por la orina durante unas horas.

En un bajo porcentaje pueden aparecer efectos más graves, que necesiten tratamientos más complicados y que pueden causar algún daño, como la aparición de dificultad para respirar, arritmia del corazón, edema de laringe, infarto de miocardio, convulsiones, alteración en el funcionamiento de los riñones, pérdida de conciencia, shock anafiláctico o parada cardiorrespiratoria. En casos muy excepcionales se puede producir la muerte.

Para intentar en lo posible prevenir riesgos es importante que comunique si me han realizado previamente estudios con contrastes yodados o fluoresceína y si tuve alguna reacción, además de si tengo alguna alergia a medicamentos u otras sustancias o cualquier enfermedad conocida, especialmente de corazón, asma o alteraciones en el riñón ó el hígado. A pesar de ello, entiendo que no existe ninguna prueba que permita conocer en qué personas se va a producir una reacción alérgica.

b).-Otros riesgos, complicaciones o secuelas que pueden aparecer teniendo en cuenta mis circunstancias personales (estado previo de salud, edad, profesión, valores, etc.) son: _____

OBSERVACION IMPORTANTE:

Aunque no existe una evidencia científica de que la fluoresceína o el verde de indocianina puedan dañar al feto, no se suele administrar este contraste en mujeres embarazadas o que crean puedan estarlo. Si cree que puede estar en estas circunstancias, comuníquelo previamente.

Las fotografías y otros materiales pueden ser utilizados con propósitos científicos, estando garantizada la confidencialidad de su identidad en las fotografías, así como en el texto descriptivo que las acompaña.

Si **NO** desea que se utilicen con esos fines, marque este recuadro

Antes de firmar este consentimiento, si desea que le facilitemos más información o tiene alguna duda, no tenga reparos en preguntarnos. Le atenderemos con mucho gusto.

DECLARO haber recibido información verbal clara y sencilla sobre el procedimiento que se me va a realizar y además he leído este escrito. Asimismo, todas mis dudas y preguntas han sido convenientemente aclaradas y he comprendido toda la información que se me ha proporcionado sobre la intervención, para qué sirve, cómo se hace, los riesgos que tiene y las posibles alternativas, así como que no existen garantías sobre el resultado final satisfactorio. Por ello, libremente, doy mi **CONSENTIMIENTO** a los profesionales adecuados que se precisen, para que se me (le) realice la prueba descrita.

PUEDO RETIRAR ESTE CONSENTIMIENTO CUANDO LO DESEE.

Se me proporcionará una COPIA de este documento si lo solicito.

Observaciones del paciente: _____

Firma del paciente:
(familiar o representante,
en caso de incapacidad)

Firma del médico:

Fdo: _____
Fecha: _____

Fdo: _____
Fecha: _____



**Hospital Clínico
San Carlos**
Comité de Ética para la
Asistencia Sanitaria
Comunidad de Madrid

Versión/Enero 2008

Ficha de recogida de datos

Paciente **Fecha** ___/___/___

Edad: ___ **Sexo:** Varón Mujer

Iniciales _____ **Raza:** Caucásico Negro Hispano Otra

Antecedentes no oftalmológicos:

- HTA en tto con _____
- DL en tto con _____
- DM en tto con _____
- Terapia hormonal sustitutiva
- Otras patologías (especificar) _____
- _____
- _____
- Tabaquismo
 - < 10 cigarrillos/día
 - => 10 cigarrillos/día

OJO EN ESTUDIO: OD OI

Catarata:

Antecedentes oftalmológicos:

- Vitaminas para la mácula (min 1 comp/d; 6 m tto; continuado)
- Color del iris:**
 - Pigmentado
 - Poco pigmentado
- Estado del ojo contralateral:**
 - MAE
 - DMAE atrófica
 - DMAE exudativa
 - Recibió/recibe tto por DMAE Operado de cataratas
 - No
 - Si, hace más de un año
 - Si, hace 6 meses- 1 año
 - Si, hace menos de 6 meses

Agudeza visual

OD: _____

OI: _____

PIO: _____

OD: _____

OI: _____

OBLIGADO: no usa PG s; no miope magno; no RDiabética

<p>Hallazgos retinografía</p> <p>Mácula estructurada <input type="checkbox"/></p> <p>Distrofia en patrón <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas duras <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas blandas (número) <input type="checkbox"/></p> <p>Atrofia geográfica <input type="checkbox"/></p> <p>Membrana neovascular <input type="checkbox"/></p>	<p>VISITA PRECIRUGÍA</p> <p>Ojo a estudio <input type="checkbox"/> Ojo adelfo <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p>	<p>Hallazgos retinografía</p> <p>Mácula estructurada <input type="checkbox"/></p> <p>Distrofia en patrón <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas duras <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas blandas (número) <input type="checkbox"/></p> <p>Atrofia geográfica <input type="checkbox"/></p> <p>Membrana neovascular <input type="checkbox"/></p>	<p>VISITA 1 MES POSTCIRUGÍA</p> <p>Ojo a estudio <input type="checkbox"/> Ojo adelfo <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p>	<p>Hallazgos retinografía</p> <p>Mácula estructurada <input type="checkbox"/></p> <p>Distrofia en patrón <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas duras <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas blandas (número) <input type="checkbox"/></p> <p>Atrofia geográfica <input type="checkbox"/></p> <p>Membrana neovascular <input type="checkbox"/></p>	<p>VISITA 6 MESES POSTCIRUGÍA</p> <p>Ojo a estudio <input type="checkbox"/> Ojo adelfo <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p>	<p>Hallazgos retinografía</p> <p>Mácula estructurada <input type="checkbox"/></p> <p>Distrofia en patrón <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas duras <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas blandas (número) <input type="checkbox"/></p> <p>Atrofia geográfica <input type="checkbox"/></p> <p>Membrana neovascular <input type="checkbox"/></p>	<p>VISITA 12 MESES POSTCIRUGÍA</p> <p>Ojo a estudio <input type="checkbox"/> Ojo adelfo <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p>	<p>Agudeza visual</p> <p>OD: <input type="text"/></p> <p>OI: <input type="text"/></p> <p>Observaciones:</p>
<p>Hallazgos retinografía</p> <p>Mácula estructurada <input type="checkbox"/></p> <p>Distrofia en patrón <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas duras <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas blandas (número) <input type="checkbox"/></p> <p>Atrofia geográfica <input type="checkbox"/></p> <p>Membrana neovascular <input type="checkbox"/></p>	<p>Agudeza visual</p> <p>OD: <input type="text"/></p> <p>OI: <input type="text"/></p> <p>Observaciones:</p>							
<p>Hallazgos retinografía</p> <p>Mácula estructurada <input type="checkbox"/></p> <p>Distrofia en patrón <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas duras <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas blandas (número) <input type="checkbox"/></p> <p>Atrofia geográfica <input type="checkbox"/></p> <p>Membrana neovascular <input type="checkbox"/></p>	<p>Agudeza visual</p> <p>OD: <input type="text"/></p> <p>OI: <input type="text"/></p> <p>Observaciones:</p>							
<p>Hallazgos retinografía</p> <p>Mácula estructurada <input type="checkbox"/></p> <p>Distrofia en patrón <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas duras <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas blandas (número) <input type="checkbox"/></p> <p>Atrofia geográfica <input type="checkbox"/></p> <p>Membrana neovascular <input type="checkbox"/></p>	<p>Agudeza visual</p> <p>OD: <input type="text"/></p> <p>OI: <input type="text"/></p> <p>Observaciones:</p>							
<p>Hallazgos retinografía</p> <p>Mácula estructurada <input type="checkbox"/></p> <p>Distrofia en patrón <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas duras <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas blandas (número) <input type="checkbox"/></p> <p>Atrofia geográfica <input type="checkbox"/></p> <p>Membrana neovascular <input type="checkbox"/></p>	<p>Agudeza visual</p> <p>OD: <input type="text"/></p> <p>OI: <input type="text"/></p> <p>Observaciones:</p>							

<p>Hallazgos OCT</p> <p>Normal <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas <input type="checkbox"/></p> <p>NVC <input type="checkbox"/></p> <p>Desgarro EPR <input type="checkbox"/></p> <p>DEP <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/></p> <p>Altura M Basal-EPR <input type="checkbox"/></p> <p>Desprendimiento RNS <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/></p> <p>Altura M Basal-MLI <input type="checkbox"/></p> <p>Cicatriz fibrosa <input type="checkbox"/></p> <p>EMC <input type="checkbox"/></p> <p>Altura máxima macular (en μ) <input type="checkbox"/></p>	<p>Hallazgos OCT</p> <p>Normal <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas <input type="checkbox"/></p> <p>NVC <input type="checkbox"/></p> <p>Desgarro EPR <input type="checkbox"/></p> <p>DEP <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/></p> <p>Altura M Basal-EPR <input type="checkbox"/></p> <p>Desprendimiento RNS <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/></p> <p>Altura M Basal-MLI <input type="checkbox"/></p> <p>Cicatriz fibrosa <input type="checkbox"/></p> <p>EMC <input type="checkbox"/></p> <p>Altura máxima macular (en μ) <input type="checkbox"/></p>	<p>VISITA PRECIRUGÍA</p> <p>Ojo a estudio <input type="checkbox"/></p> <p>Ojo adelifo <input type="checkbox"/></p>	<p>VISITA 1 MES POSTCIRUGÍA</p> <p>Ojo a estudio <input type="checkbox"/></p> <p>Ojo adelifo <input type="checkbox"/></p>
<p>Hallazgos OCT</p> <p>Normal <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas <input type="checkbox"/></p> <p>NVC <input type="checkbox"/></p> <p>Desgarro EPR <input type="checkbox"/></p> <p>DEP <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/></p> <p>Altura M Basal-EPR <input type="checkbox"/></p> <p>Desprendimiento RNS <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/></p> <p>Altura M Basal-MLI <input type="checkbox"/></p> <p>Cicatriz fibrosa <input type="checkbox"/></p> <p>EMC <input type="checkbox"/></p> <p>Altura máxima macular (en μ) <input type="checkbox"/></p>	<p>Hallazgos OCT</p> <p>Normal <input type="checkbox"/></p> <p>Drusas <input type="checkbox"/></p> <p>NVC <input type="checkbox"/></p> <p>Desgarro EPR <input type="checkbox"/></p> <p>DEP <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/></p> <p>Altura M Basal-EPR <input type="checkbox"/></p> <p>Desprendimiento RNS <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/></p> <p>Altura M Basal-MLI <input type="checkbox"/></p> <p>Cicatriz fibrosa <input type="checkbox"/></p> <p>EMC <input type="checkbox"/></p> <p>Altura máxima macular (en μ) <input type="checkbox"/></p>	<p>VISITA 6 MESES POSTCIRUGÍA</p> <p>Ojo a estudio <input type="checkbox"/></p> <p>Ojo adelifo <input type="checkbox"/></p>	<p>VISITA 12 MESES POSTCIRUGÍA</p> <p>Ojo a estudio <input type="checkbox"/></p> <p>Ojo adelifo <input type="checkbox"/></p>

ADENDUM

Según la normativa de desarrollo (Real Decreto 99/2011, BOE 10/02/2011) para la regulación de los Estudios de Doctorado en la Universidad Complutense de Madrid

SUMMARY

SUMMARY

■ INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of legal blindness in people over 65 years in developed countries. AMD is a disease associated with ageing in which there is a decline in sharp, central vision since the more frequently affected area is the central portion of the retina called macula. Central vision is needed for seeing objects clearly and for common tasks of daily living such as reading and driving.

There are many forms of AMD but the two major types are non-exudative or atrophic or “dry”, and exudative or neovascular or “wet” AMD. The non-exudative form of AMD is characterized by the presence of yellow deposits, called drusen, in the macula, and sharply defined focal areas of retinal pigment epithelium (RPE) atrophy and degeneration of photoreceptors. This leads to a gradual loss of central vision. Progression tends to be slower than in neovascular type. At present there is no known cure for the “dry” type of AMD. The “wet” form of AMD is characterized by choroidal neovascularization (CNV), in which aberrant blood vessels from the choroid underneath the macula grow into the sub-RPE space. These new blood vessels show abnormal permeability and leak fluid or blood in the retina, causing retinal oedema and haemorrhages that lead to an abrupt deterioration of visual function. This abnormal process eventually results in a disciform scar, causing permanent loss of central vision. Treatment with antiangiogenic agents, directly injected into the vitreous, is currently the primary therapy for neovascular AMD. Antiangiogenic treatment reduces the clinical signs of the disease and substantially improves visual acuity in a number of patients. Lately, optical coherence tomography (OCT) imaging has provided an extremely useful tool in managing and follow-up of these patients. OCT is a non-invasive technique, complementary to fluorescein angiography, which is being increasingly used as an important part of the structural assessment of patients.

A number of risk factors for neovascular AMD have been described including cataract surgery and genetic factors. Although cataract surgery is an effective treatment for cataract-induced visual loss, some studies have shown that such an intervention may increase the risk

for AMD development or AMD progression, and thus have deleterious effects on vision. However there is not agreement in the scientific community about the risks and benefits of cataract surgery to these patients. It is important for clinical practice to solve this question, because cataracts and AMD are often concurrent in the elderly, since both pathologies are associated to ageing.

Nowadays the crucial role played by genetic factors in the development of AMD is clearly established and it is known that the presence of some polymorphisms increases the risk for the disease. In western populations of European ancestries, it has been consistently shown the association of AMD with two single nucleotide polymorphisms: Y402H (rs1061170, T/C) in the complement factor H gene, *CFH*, and A69S (rs10490924, G/T) in the *LOC 387715/ARMS2* gene of still unknown function. It would be interesting to replicate this association in Spanish population, for the studies on this population are scarce.

More recently, research on the potential influence of genetic factors on the response of patients to antiangiogenic therapy is beginning to be studied. Although the therapy with antiangiogenic agents (ranibizumab, bevacizumab) has revolutionized the treatment of neovascular AMD, it is not successful in all the patients, and it is not possible yet to know which will benefit from the treatment or which will maintain good results in the long term. Pharmacogenetics studies could allow us to identify polymorphisms related with the individual response of the patients to antiangiogenic treatment.

Finding other predictive factors, especially those easily determinable in clinical practice, would be very useful for tailored treatments. In this regard, the modern technology of spectral-domain OCT (SD-OCT) has led to a significant improvement in OCT imaging performance compared to the first generation time-domain OCT. It provides more detailed information on the status of retinal structures and might be useful to identify tomographic parameters with prognostic value of visual function.

■ OBJECTIVES

This Doctoral Thesis was designed with four well-defined objectives:

- 1°. To determine whether phacoemulsification cataract surgery is a risk factor for development of neovascular AMD.
- 2°. To study the association of the polymorphisms Y402H (rs1061170) in the *CFH* gene and A69S (rs10490924) in the *LOC387715/ARMS2* gene with neovascular AMD in Spanish population from Madrid Autonomous Community.
- 3°. To determine whether the genotype of the patients with respect to Y402H and A69S polymorphisms is related with clinical features of the pathology at baseline and/or with the response to a *pro re nata* dosing regimen with intravitreal injections of ranibizumab (*Lucentis*®).
- 4°. To evaluate the utility of macular morphological parameters determined by spectral-domain optical coherence tomography as predictive factors of the response to ranibizumab (*Lucentis*®) in order to their possible application in clinical practice.

■ MATERIAL AND METHODS

Three different studies were designed:

Study I: Prospective, cohort, 1-year study that included 93 patients with normal macula and 79 patients with incipient AMD all of which were subjected to phacoemulsification cataract surgery. Tomographic evaluation with SD-OCT was carried out in all the patients before and after the intervention, and angiography was performed in those cases in which neovascularisation was suspected.

Study II: Case-control study including 103 patients with neovascular AMD and 117 age-matched controls of advanced age. Genomic DNA was isolated from whole blood samples and the genetic analysis was performed to determine genotypes for Y402H and A69S polymorphisms.

Study III: Retrospective, observational study with 103 patients clinically diagnosed with neovascular AMD in our Hospital Service and treated exclusively with intravitreal injections of

ranibizumab (loading phase followed by a *pro re nata* regimen). Follow-up ranged from twelve to thirty six months. Baseline angiography and OCT, and subsequent OCTs were performed in every visit. A genetic analysis for the above indicated polymorphisms was conducted. The study of macular morphology with spectral-domain OCT was carried out with 47 patients from the sample; the response to ranibizumab treatment through twelve months was evaluated and its potential relationship with different tomographic parameters was analysed.

■ RESULTS

The most relevant results obtained in these studies are summarized below:

Study I:

No patient developed choroidal neovascularisation through a 12-month follow up.
SD-OCT was more sensitive than funduscopy detecting changes.
Visual acuity improved two or more ETDRS lines in 91,4% of eyes subjected to surgery.
The gain of visual acuity was statistically greater in those patients without associated AMD (12,3 ETDRS letters <i>versus</i> 6,2).

Study II:

Table 1.- Association of the Y402H and A69S polymorphisms with exudative AMD in Spanish population of the Madrid Community. Allele and genotype distribution in controls and patients with neovascular AMD:

SNP Y402H (CFH gene)						
C, risk allele	TT Genotype		TC Genotype		CC Genotype	
Frequency Control AMD	% Control	OR AMD (Reference)	% Control	OR AMD (TC vs TT)	% Control	OR AMD (CC vs TT)
0,308 0,519	47,0	21,4	1	44,4 53,4	2,64	8,5 25,2 6,5
SNP A69S (LOC387715/ARMS2 gene)						
T, risk allele	GG Genotype		GT Genotype		TT Genotype	
Frequency Control AMD	% Control	OR AMD (Reference)	% Control	OR AMD (GT vs GG)	% Control	OR AMD (TT vs GG)
0,154 0,426	70,9	34,3	1	27,4 46,1	3,48	1,7 19,6 23,71

Frequency of the risk alleles and percentages of the different genotypes for the Y402H y A69S polymorphisms in controls and patients with neovascular AMD are indicated. OR: *odds ratio*.

Study III:

Table 2.- Functional response of patients with neovascular AMD to intravitreal ranibizumab (0,5 mg/0,05 ml) treatment consisting of loading phase followed by a *pro re nata* (PRN) regimen.

N° patients <i>Follow-up</i>	Average Gain (ETDRS letters)			≥ 15 letters increase % patients			< 15 letters decrease % patients			Total number of injections	
	M 3	1 year	2 years	M 3	1 year	2 years	Load	1 year	2 years	1 year	2 years
N = 103/ 90 1 and 2 years	8,1	7,7	6,7	27,2	29,1	23,3	98,0	96,1	94,4	5,3	8,9
N = 54 3 years	9,3	8,7	6,7	29,6	29,6	20,4	100	96,3	96,3	4,8	8,1
	3 years: 4,1			3 years: 25,9			3 years: 90,7			3 years:14,2	

ETDRS letters: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study charts. M3: the indicated variables were determined at the end of the loading phase, three months after diagnosis was made.

- The therapy with ranibizumab according to a protocol consisting in loading phase followed by a PRN regimen was successful in actual clinical practice to improve vision in patients with neovascular AMD. However, a gradual deterioration (44%) of mean visual acuity after the loading dose was observed after a follow up of three years. The mean number of total injections received by the patients at the end of the follow up was not correlated with final visual outcome.
- The presence of two copies of the risk allele of the A69S polymorphism for *LOC 387715/ARMS2* gene was associated to a significantly greater number of re-treatments with ranibizumab at the end of the thirty six-month follow up. Y402H and A69S polymorphisms of *CFH* and *LOC 387715/ARMS2* genes, respectively, were neither related with functional response to antiangiogenic therapy nor with the treatment-induced changes of macular morphology, except for the status of IS/OS line.
- Visual acuity at baseline is the most important predictive factor of final visual acuity regardless genetic background.

- Visual acuity at the end of a one-year follow up was correlated with the following tomographic parameters: central retinal thickness at baseline, and status at baseline and at the end of the loading phase of the lines that represent photoreceptor inner and outer segment junction (IS/OS line) and external limiting membrane (ELM line). Multiple regression analysis showed that the IS/OS line status after the loading phase was the variable contributing to final visual acuity.

■ CONCLUSIONS

1. Spectral domain optical coherence tomography is extremely useful in management of patients at risk of AMD progression. Measurements determined with the equipment of Spectralis show excellent reproducibility.
2. Phacoemulsification cataract surgery does not constitute a risk factor for development of choroidal neovascularization at short-medium term, and contributes to the improvement of visual acuity in patients with early AMD.
3. Ranibizumab therapy administered on an as-needed basis is successful to improve vision in neovascular AMD patients during a three-year follow-up. One quarter of patients achieves a mean gain of fifteen or more ETDRS letters, a threshold that represent a significant improvement in quality of life.
4. The mean total number of injections received by the patients at the end of the follow-up is not related with final visual acuity.
5. The polymorphisms Y402H of *CFH* gene and A69S of *LOC387715/ARMS2* gene are strongly associated with neovascular AMD in Spanish patients from Madrid Community. One copy of the risk allele C (polymorphism Y402H) duplicates the possibility of suffering the pathology. Two copies multiply the risk for a factor of six. Association for the polymorphism A69S is stronger since one or two copies of the T allele increase this risk three and twenty three times, respectively.

- 6.** The presence in homozygosis of the risk allele for the A69S polymorphism is associated to a greater number of re-treatments in the long term with intravitreal ranibizumab.
- 7.** No relationship between Y402H and A69S polymorphisms and functional response was found.
- 8.** Visual acuity at baseline is the most important predictive factor for final visual acuity irrespective of genetic background.
- 9.** Central retinal thickness at baseline, and status of IS/OS and ELM lines at baseline and after the loading phase, determined by spectral-domain optical coherence tomography, are related with visual acuity at the end of a one-year follow up.
- 10.** The risk genotype for the Y402H polymorphisms is related with an unfavourable evolution of the line IS/OS status after twelve months of treatment with ranibizumab.

