

M^a Olivia Esteban Floría

Influencia de los halogrupos del
DNA mitocondrial en la respuesta
a la terapia intravítrea con
ranibizumab en pacientes con
degeneración macular asociada a
la edad avanzada neovascular

Departamento

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es

RUIZ PESINI, EDUARDO
ASCASO PUYUELO, FRANCISCO JAVIER

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

INFLUENCIA DE LOS HALOGRUPOS DEL DNA
MITOCONDRIAL EN LA RESPUESTA A LA
TERAPIA INTRAVÍTREA CON RANIBIZUMAB EN
PACIENTES CON DEGENERACIÓN MACULAR
ASOCIADA A LA EDAD AVANZADA
NEOVASCULAR

Autor

M^a Olivia Esteban Floría

Director/es

RUIZ PESINI, EDUARDO
ASCASO PUYUELO, FRANCISCO JAVIER

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2019

**INFLUENCIA DE LOS HAPLOGRUPOS DEL DNA
MITOCONDRIAL EN LA RESPUESTA A LA TERAPIA
INTRAVÍTREA CON RANIBIZUMAB EN PACIENTES CON
DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD
AVANZADA NEOVASCULAR.**

*Universidad de Zaragoza
Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia.*



TESIS DOCTORAL

Maria Olivia Esteban Floría

DIRECTORES

Eduardo Ruiz Pesini y Fco. Javier Ascaso Puyuelo.

ZARAGOZA 2019



Influencia de los haplogrupos de mtDNA en la respuesta a la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes con DMAE avanzada neovascular.



Influencia de los haplogrupos de mtDNA en la respuesta a la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes con DMAE avanzada neovascular.



Influencia de los haplogrupos de mtDNA en la respuesta a la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes con DMAE avanzada neovascular.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores,

A Javier Ascaso, por ser mi guía, mi mentor y un pilar esencial en mi formación y en la presente tesis. Gracias por los consejos y el apoyo constante.

A Eduardo Ruiz Pesini, por abrirme una pequeña ventana al apasionante mundo de la genética mitocondrial, por tu visión científica y por formar parte de este proyecto.

Al Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, mis compañeros y amigos, las personas que forman y han formado parte de este servicio, mi casa, con quienes he crecido tanto profesional como personalmente, a cada uno de vosotros, que formáis parte de esta tesis.

Y a toda mi familia, por su apoyo incondicional,

en especial,

Gracias a mi padre Juan, por inculcarme valores de sacrificio y constancia diarios, por animarme a ser mejor persona cada día.

Gracias a mi madre M^a Carmen, por sus consejos y entrega constante, por ser la fuente inagotable de la experiencia, comprensión y cariño.

Gracias a mis hermanas Belén y M^a Carmen, por estar siempre a mi lado, remando en el mismo barco, por ser mis amigas y confidentes.

Gracias a ti Luis, por reaparecer en mi vida.



Influencia de los haplogrupos de mtDNA en la respuesta a la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes con DMAE avanzada neovascular.



*“...la ciencia ilumina al mundo mirando
donde otros no ven...”*



Influencia de los haplogrupos de mtDNA en la respuesta a la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes con DMAE avanzada neovascular.

ÍNDICE GENERAL

1. LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (DMAE).....	17
Epidemiología en DMAE.....	19
Clínica, clasificación y diagnóstico en DMAE.....	20
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y tratamiento en DMAE.....	25
Ranibizumab en DMAE.....	27
Factores de riesgo en DMAE.	33
2.MITOCONDRIA, HAPLOGRUPOS DE mtDNA Y SISTEMA OXPPOS EN DMAE.	40
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	46
Hipótesis.....	46
Objetivos	47
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	50
4.1 Diseño de Estudio.....	50
4.2 Materiales y recursos utilizados.....	51
4.3 Sujetos.....	52
4.4 Criterios de inclusión.....	52
4.5 Criterios de exclusión.....	53
4.6 Protocolo y parámetros de estudio.....	53
4.7 Análisis de DNA mitocondrial (mtDNA).....	58
5 - RESULTADOS:	66
Análisis descriptivo.....	70
Análisis estadístico	82
6. DISCUSIÓN:	112
1.Características poblacionales.....	112
2.Comparabilidad de los resultados en términos de AV: respuesta funcional.....	113
3.Comparabilidad de los resultados en términos de grosor retiniano medido por OCT: respuesta morfológica.....	116
4.Tipos de respuesta al tratamiento.....	117
5.Implicaciones pronósticas y terapéuticas de los diferentes subtipos neovasculares.....	122
6.Factores predictores de respuesta.....	124
7.Haplogrupos de mtDNA y genética mitocondrial.....	125
8.Sistema OXPPOS y angiogénesis.....	127
9.Limitaciones del estudio.....	133
7. CONCLUSIONES	136
8. ANEXOS.....	140
9. BIBLIOGRAFÍA.....	146

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AV: agudeza visual

AVI: Angiografía con verde de indocianina.

CFH: Factor H del complemento.

DMAE: Degeneración Macular Asociada a la Edad.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study

EPR: epitelio pigmentario de la retina.

GF: Grosor foveal.

GM: grosor macular.

HTA: hipertensión arterial.

LogMAR: Logaritmo del mínimo ángulo de resolución.

mRNA: RNA mensajero.

mtDNA: DNA mitocondrial.

nDMAE: Degeneración macular asociada a la edad de tipo neovascular.

nDNA: DNA nuclear.

NVC: neovascularización

OCT: Tomografía de coherencia óptica.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PRN: pro re nata.

RAP: Proliferación Angiomatosa Retiniana.

RNA: Ácido ribonucleico.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

SD-OCT: Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral.

SNPs: polimorfismos de nucleótidos únicos.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

VCP: Vasculopatía coroidea polipodea.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de la DMAE según la edad.....	33
Tabla 2. Factores genéticos asociados con DMAE.	34
Tabla 3. Determinación haplogrupos mediante PCR.....	62
Tabla 4. Distribución del número de ojos y pacientes según haplogrupos de mtDNA.	70
Tabla 5. Distribución de la afectación ocular según género.....	70
Tabla 6. Distribución de haplogrupos de mtDNA en función del género.....	71
Tabla 7. Edad media (años) de los pacientes en los diferentes haplogrupos de mtDNA.	72
Tabla 8. Factores de riesgo y su porcentaje en la muestra.	72
Tabla 9. Distribución de factores de riesgo según los haplogrupos de mtDNA.	73
Tabla 10. Relación de pacientes con o sin HTA en función del haplogrupo de mtDNA.	74
Tabla 11. Relación de pacientes con o sin tabaquismo en función del haplogrupo de mtDNA.	75
Tabla 12. Relación de pacientes con o sin Diabetes en función del haplogrupo de mtDNA.	76
Tabla 13. Relación de pacientes con o sin Dislipemia en función del haplogrupo de mtDNA.	77
Tabla 14. Agudeza visual media medido en número de letras de ETDRS según haplogrupos de mtDNA en estado basal.	78
Tabla 15. Grosor foveal medio medido en μm según haplogrupos de mtDNA en estado basal.....	78
Tabla 16. Análisis de la afectación foveal según haplogrupos de mtDNA.....	79
Tabla 17. Grosor macular medio medido en estado basal según haplogrupos de mtDNA....	80
Tabla 18. Análisis del número de áreas maculares afectas según haplogrupo de mtDNA. ..	80
Tabla 19. Análisis del tipo de membrana neovascular según el haplogrupo de mtDNA.....	81
Tabla 20. Número de inyecciones de media según haplogrupos de mtDNA tras 52 semanas.....	82
Tabla 21. Número de ojos/pacientes según haplogrupos de mtDNA a las 52 semanas.	83
Tabla 22. Distribución del género en función del haplogrupo de mtDNA a las 52 semanas.	83
Tabla 23. Distribución de la media de edad según haplogrupos de mtDNA a las 52 semanas.	84
Tabla 24. Tipos de membrana neovascular según haplogrupos mtDNA a las 52 semanas....	85
Tabla 25. Agudeza Visual (AV) media medida en número de letras en estado basal, a las 16 semanas.	86
Tabla 26. Grosor foveal (GF) medio en μm en estado basal, a las 16 semana y a las 52 semanas.....	88
Tabla 27. Grosor macular (GM) medio en μm en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas de seguimiento.	90
Tabla 28. Grosor macular medio en μm en cada segmento de OCT en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas.	92
Tabla 29. Resumen de la evolución de la AV en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas haplogrupos de mtDNA.	94
Tabla 30. Comparación de AV entre basal y 16 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor estadístico (p).	95
Tabla 31. Comparación de AV entre 16 y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor estadístico (p).	96

Tabla 32. Comparación de AV entre basal y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).	96
Tabla 33. Valor del tamaño del efecto de AV en las comparaciones por pares de medidas por grupo y tiempo.	97
Tabla 34. Resumen de la evolución del Grosor foveal en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas según haplogrupos de mtDNA.	98
Tabla 35. Comparación del GFC basal y a las 16 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor estadístico (p).	100
Tabla 36. Comparación de Grosor foveal entre 16 y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).	100
Tabla 37. Comparación de Grosor foveal basal y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).	101
Tabla 38. Valor del tamaño del efecto del Grosor Foveal en las comparaciones por pares de medidas por grupo y tiempo.	102
Tabla 39. Resumen de la evolución del grosor foveal en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas según haplogrupos de mtDNA.	103
Tabla 40. Comparación de Grosor macular entre basal y 16 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).	104
Tabla 41. Comparación de grosor macular entre 16 y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).	105
Tabla 42. Comparación de grosor macular entre basal y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).	106
Tabla 43. Valor del tamaño del efecto del Grosor Macular en las comparaciones por pares de medidas por grupo y tiempo.	106

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de hombres y mujeres según haplogrupos mtDNA (%).....	71
Gráfico 4. Distribución de factores de riesgo según haplogrupos de mtDNA (n).....	73
Gráfico 5. Distribución de HTA según haplogrupos de mtDNA (%).....	74
Gráfico 6. Distribución abajismo según haplogrupos de mtDNA (%).....	75
Gráfico 7. Distribución de Diabetes según haplogrupos de mtDNA (%).....	76
Gráfico 8. Distribución de Dislipemia según haplogrupos de mtDNA (%).....	77
Gráfico 9. Afectación foveal según haplogrupos mtDNA (%).....	79
Gráfico 11. Distribución del tipo de membrana neovascular según haplogrupos (%).....	81
Gráfico 12. Distribución comparativa del género en pacientes en estado basal y a las 52 semanas (%).....	84
Gráfico 13. Distribución comparativa de la edad según haplogrupos mtDNA en estado basal y a las 52 semanas (%).....	84
Gráfico 14. Distribución del tipo de membranas neovascular según haplogrupos mtDNA en estado basal y a las 52 semanas (%).....	85
Gráfico 15. Análisis de la evolución de la AV media en estado basal, tras la dosis de carga (a las 16 semanas)y tras 52 semanas.....	86
Gráfico 16. Análisis de la evolución del grosor foveal media en estado basal), tras la dosis de carga a las 16 semanas y tras 52 semanas.....	88
Gráfico 17. Análisis de la evolución del grosor macular medio en estado basal, tras la dosis de carga a las 16 semanas y tras 52 semanas.....	90
Gráfico 18. Análisis de la evolución del grosor medio según segmentos internos (Superior, Nasal, Inferior y Temporal) maculares de OCT en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas.....	93
Gráfico 19. Análisis de la evolución del grosor medio según segmentos externos (Superior, Nasal, Inferior y Temporal) maculares de OCT en estado basal, a las 16 y 52 semanas.....	93
Gráfico 20. Evolución de AV media según haplogrupos mtDNA.....	94
Gráfico 21. Evolución grosor foveal medio según haplogrupos mtDNA.....	99
Gráfico 22. Evolución grosor macular medio según haplogrupos mtDNA.....	104
Gráfico 23. Número de letras ganadas en ETDRS según haplogrupos de mtDNA tras la dosis de carga y tras 52 semanas de.....	107
Gráfico 24. Reducción (%) del grosor foveal tras la dosis de carga según haplogrupos de mtDNA.....	108
Gráfico 25. Reducción (%) del grosor foveal tras 52 semanas de tratamiento según haplogrupos de mtDNA.....	108
Gráfico 26. Reducción (%) del grosor macular tras la dosis de carga según haplogrupos de mtDNA.....	108
Gráfico 27. Reducción (%) del grosor macular tras 52 semanas de tratamiento según haplogrupos mtDNA.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Complejo macular en la Degeneración macular asociada a la edad avanzada neovascular.....	17
Figura 2. Escalas de clasificación y severidad de Degeneración Macular asociada a la edad.	20
Figura 3. Imágenes retinográficas.	21
Figura 4. Imágenes de SD-OCT en pacientes con DMAE avanzada neovascular.	22
Figura 5. Clasificación DMAE neovascular. Tipos de membranas neovascular y su equivalencia histológica, OCT y Angiografía.	24
Figura 6. Mecanismo de acción de los fármacos anti-VEGF.....	26
Figura 7. Síntesis de bevacizumab y ranibizumab: pasos en su síntesis.....	28
Figura 8. Sistema de fosforilación Oxidativa y mitocondria.	40
Figura 9. Tomografía de coherencia óptica macular de dominio espectral (SD-OCT).....	55
Figura 10. Estrategia de haplotipado.	61



**DEGENERACIÓN MACULAR
ASOCIADA A LA EDAD.**



Influencia de los haplogrupos de mtDNA en la respuesta a la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes con DMAE avanzada neovascular.

1. LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (DMAE)

Introducción.

La Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) es una enfermedad producida por la progresiva degeneración del complejo fotorreceptor-epitelio pigmentario de la retina (EPR)-membrana de Bruch-coroides, que afecta al área macular en personas mayores de 60 años, causando una progresiva pérdida de visión central.¹ Esto supone una grave y permanente discapacidad visual, con un importante impacto en la calidad de vida y en la independencia funcional de los pacientes (figura1).²

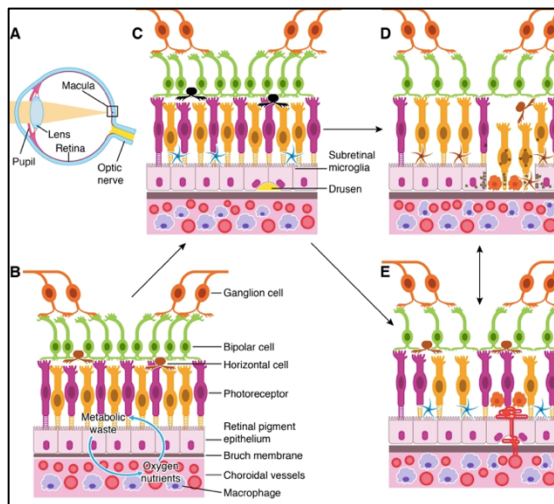


Figura 1. Complejo macular en la Degeneración macular asociada a la edad avanzada neovascular. Chen M, Xu H. Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. *J Leukoc Biol.* 2015 Nov;98(5):713-25. En retina normal (B), DMAE precoz o seca (C,D) y avanzada o neovascular (E). B: La monocapa del EPR junto con la membrana de Bruch forman la barrera hemato-retiniana externa (BHRext) que separa la retina neuroretina de la coroides. El oxígeno y los nutrientes son transportados desde la coroides a la retina externa mientras que los productos metabólicos de desecho son transportados desde la BHRext hacia la coroides. C: Los estadios iniciales de la DMAE se caracterizan por la presencia de drusas en el espacio subretiniano. D: el constante acúmulo de material de desecho junto con el empeoramiento de la funcionalidad del EPR, produce daños en la BHR externa. E. Neovascularización desde los vasos de la coroides hacia el espacio subEPR y que puede llegar a penetrar a retina interna en el área macular y establecer anastomosis retina-coroides.

Supone el 8,7% de todas las cegueras en el mundo y la causa más frecuente de pérdida visual grave en los países desarrollados en personas mayores de 60 años. Se estima que su prevalencia sufrirá un incremento considerable, pasando de 196 millones en 2020 a 288 millones de personas afectadas en todo el mundo en 2040, como consecuencia del envejecimiento exponencial que está sufriendo la población.³

La introducción en la práctica clínica diaria de la terapia anti-VEGF ha logrado reducir la incapacidad visual y la ceguera legal.⁴ Se han probado múltiples regímenes de tratamiento (“mensual”, “bimestral”, “cuatrimestral”, “Pro re nata” o “treat and extend”) en busca de un equilibrio entre el coste, la duración, la eficacia y la estandarización del mismo, y así encontrar la manera de utilizar esta terapia de la forma más eficiente posible.

Sin embargo, a pesar de su incuestionable eficacia demostrada, pues ha supuesto una revolución en el tratamiento y pronóstico de esta enfermedad, existe una importante heterogeneidad interindividual en el curso y respuesta al tratamiento, no siendo fácil determinar cómo va a ser la evolución particular de cada paciente.⁵

Se sabe que la edad es el principal factor de riesgo; no obstante, existen muchos otros factores, tanto genéticos como ambientales, que influyen no sólo en la susceptibilidad individual a padecer la enfermedad, sino también en la evolución y en la respuesta al tratamiento. Si pudiéramos identificar determinados factores que nos predijeran cómo va a ser la respuesta al tratamiento de los pacientes, podríamos adaptarlo a las características de la enfermedad y ofrecer un tratamiento más personalizado.

Epidemiología en DMAE.

Se considera la principal causa de ceguera en países desarrollados en personas mayores de 60 años, variando las tasas de incidencia según las diferentes regiones y poblaciones.⁶⁻⁸

Según un reciente metanálisis sobre la prevalencia global de ésta enfermedad, las tasas globales de DMAE en cualquier estadio son del 8,69%: considerando un 8,01% en DMAE precoz y un 0,37% en DMAE avanzada.⁸

Diferentes estudios han sugerido una fuerte influencia de la raza, siendo más frecuente en la caucásica. Así, cualquier estadio de DMAE muestra mayor prevalencia en europeos que en asiáticos (12,3% frente a 7,4%) y mayor prevalencia de DMAE en todos los estadios, precoz y avanzada en europeos que en africanos (12,3% frente a 7,5%; 11,2% frente a 7,1% y 0,5% frente a 0,3%, respectivamente). También es más frecuente la DMAE avanzada con atrofia geográfica en europeos (1,11 %) que en africanos (0,14%) o asiáticos (0,21%). Sin embargo, parece que no hay diferencias entre poblaciones en la prevalencia de DMAE avanzada exudativa.⁶

El grupo de Estudio de Epidemiología Ocular Español⁹ llevó a cabo en 2011 un estudio para conocer la prevalencia de la DMAE en España. Encontraron que la DMAE precoz o intermedia afectaba al 10,3% de los individuos mayores de 65 años, la DMAE avanzada con atrofia geográfica se cifraba en el 1,5% y la de la neovascular en el 1,9%. Así pues, la de la DMAE avanzada (atrofia geográfica o neovascular) era del 3,4% en personas mayores de 65 años, y aumentaba hasta el 8,5% en mayores de 80 años, remarcando así la importancia del factor edad en esta enfermedad. Afirmando que la DMAE debe considerarse un problema de salud pública en España, por el incremento de la esperanza de vida que supondrá un estimado crecimiento de la prevalencia de esta enfermedad.¹⁰

Clínica, clasificación y diagnóstico en DMAE.

La DMAE precoz o intermedia puede ser asintomática o debutar con síntomas como dificultad para la lectura, leve distorsión central en las tareas de cerca, ver la televisión o conducir, dificultad de visión en condiciones de baja luminancia o alteración de la sensibilidad al color y contraste.

En la DMAE avanzada los pacientes aquejan pérdida de visión central de forma rápida, escotomas, metamorfopsia (semanas o meses) cuando se trata de la forma neovascular; o más lentamente (meses o años) cuando evoluciona hacia la atrofia geográfica.²

En 2013 se propuso la unificación de la clasificación y terminología de la DMAE hasta entonces no consensuada y que dificultaba la comparabilidad de los estudios así como la elaboración de guías de práctica clínica. Esta nueva clasificación, permite unificar la terminología, la definición, la escala de gravedad y los tipos de DMAE (figura2).

Clasificación clínica de DMAE	
Cambios clínicos de la edad	Pequeñas drusas $\leq 63\mu\text{m}$ y sin anomalías en el pigmento.
DMAE precoz	Drusas tamaño medio $> 63\mu\text{m}$ y $\leq 125\mu\text{m}$, sin anomalías en el pigmento.
DMAE intermedia	Drusas grandes $\geq 125\mu\text{m}$ o alteraciones en el pigmento.
DMAE tardía	DMAE neovascular o atrofia geográfica.
Clasificación severidad AREDS de DMAE	
0	No hay drusas grandes ($>125\mu\text{m}$) o cambios pigmentarios en cualquier ojo.
1	Drusas grandes o cambios pigmentarios en un ojo solo.
2	Drusas grandes y cambios pigmentarios en un ojo solo; o drusas grandes o cambios pigmentarios en ambos ojos; o DMAE neovascular o atrofia geográfica en un ojo.
3	Drusas grandes y cambios pigmentarios en un ojo; y drusas grandes o cambios pigmentarios en el otro ojo.
4	Drusas grandes y cambios pigmentarios en ambos ojos.

Figura 2. Escalas de clasificación y severidad de Degeneración macular asociada a la edad. Tabla tomada de Ferris y cols. Clinical classification of age-related macular degeneration. Ophthalmology 2013 Apr;120 (4):844-51.

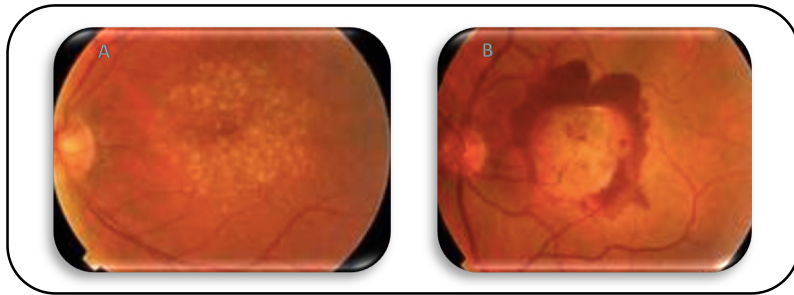


Figura 3. Imágenes retinográficas. A: DMAE intermedia. B: DMAE avanzada neovascular.

Las drusas es un de los signos más tempranos que aparecen en la DMAE. Son depósitos residuales de material extracelular de color amarillento (lipofuscina y lipoproteínas) resultado del producto de desecho acumulado, consecuencia de la disfunción del EPR (encargado de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores), y que se sitúa en el espacio subretiniano, entre la membrana basal de las células del EPR y la zona colágena interna de la membrana de Bruch.

Las alteraciones del EPR que encontramos en la DMAE son muy diversas. Desde regiones de hiperpigmentación o despigmentación, desprendimientos del EPR (drusenoide, seroso, vascularizado) hasta rupturas del propio epitelio como consecuencia de las fuerzas tracción que ejerce la formación del complejo neovascular.

La neovascularización presente en fases avanzadas de la DMAE, se caracteriza por el desarrollo o proliferación de neovasos que migran desde la coriocapilar (bajo del EPR) hasta la retina neurosensorial, o desde las capas neurosensoriales de la retina creciendo en profundidad hacia la coroides en el área macular, llegando a establecerse conexiones entre la vascularización retiniana y coroidea.¹¹

Este complejo vascular neoformado, se manifiesta a través de diferentes lesiones clínicas a nivel retiniano: presencia de extravasación de fluido o hemorragias (intraretiniana o subretiniana) a nivel macular, lo que supone un engrosamiento del espesor macular medido mediante tomografía

de coherencia óptica (OCT); roturas o desprendimientos del EPR y la posterior formación de complejos fibrosos y/o material cicatricial a nivel macular que provocan una pérdida significativa de visión.

La introducción de la OCT en la práctica clínica diaria ha supuesto un gran avance para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad que tradicionalmente se realizaba a través de los síntomas clínicos (metamorfopsia, escotoma central, alteración de la sensibilidad al color, dificultad para la lectura o disminución de la agudeza visual) junto con al examen clínico oftalmoscópico, el apoyo de la retinografía y la angiografía con fluoresceína o verde de indocianina.

En la actualidad, gracias a la imagen multimodal que obtenemos a través de la OCT de dominio espectral (SD-OCT) y mucho más recientemente con la angiografía-OCT, podemos observar con precisión todas estas manifestaciones de la neovascularización y obtener información sobre el tamaño, la localización y la presencia de actividad neovascular (figura 4).

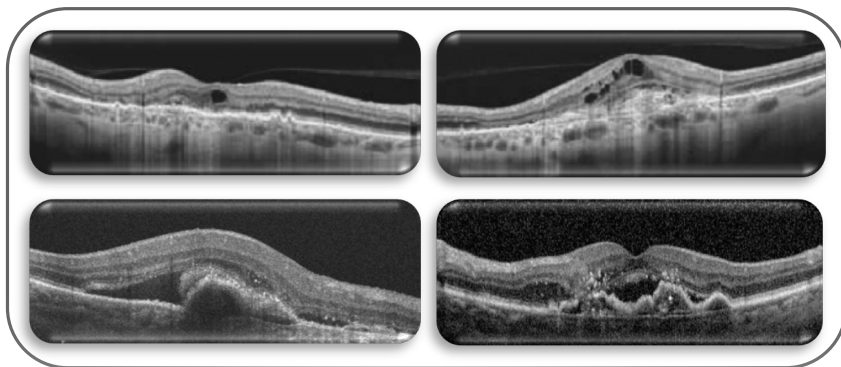


Figura 4. Imágenes de SD-OCT en pacientes con DMAE avanzada neovascular.

La Angiografía con fluoresceína (AGF) o verde de indocianina (AVI) tuvo una gran importancia en el pasado para la clasificación de las membranas neovasculares, ya que los resultados -tanto con láser térmico como con la

terapia fotodinámica- dependían del tipo de membrana neovascular que presentaba el paciente. Diferenciaba membranas:

-Predominantemente clásicas: con patrón en rueda de carro con una extensión mayor del 50% del tamaño total de la lesión.

-Ocultas: no se evidencia el patrón típico en rueda de carro. Puede apreciarse hiperfluorescencia tardía de origen desconocido o desprendimiento fibrovascular del EPR.

-Membranas ocultas con identidad propia:

- ✓ RAP: Proliferación angiomasiosa retiniana, donde la angiografía con verde de indocianina es fundamental para establecer el diagnóstico de certeza.
- ✓ Vasculopatía polipoidea idiopática: dilataciones vasculares polipoideas en la coroides que se asocian a sangrados repetidos subretinianos.

Hoy en día, nos es útil para detectar algunos tipos de membranas neovasculares coroides ocultas de forma complementaria a la OCT.

Basándose en las imágenes de OCT y en la clasificación histológica de Gass¹², Freud y cols.¹³ propusieron una nueva forma de identificar y tipificar las membranas o complejos neovasculares que aparecen en la DMAE avanzada neovascular (figura 5). Para ello utilizan la OCT, prueba no invasiva y de fácil acceso, convertida en el gold-estándar para el análisis cualitativo y cuantitativo en el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de esta enfermedad.

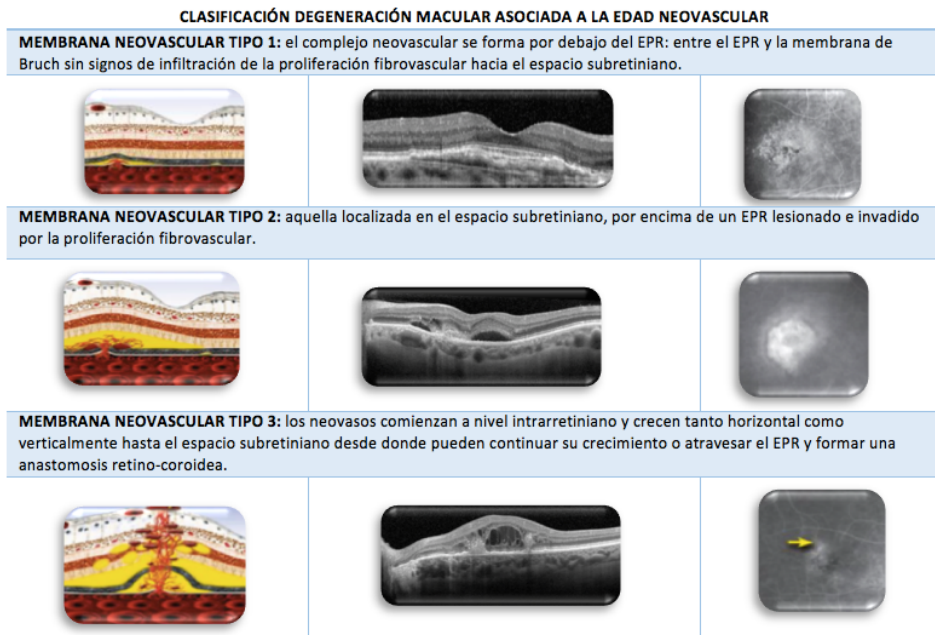


Figura 5. Clasificación DMAE neovascular. Tipos de membranas neovascular y su equivalencia histológica, OCT y Angiografía.

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y tratamiento en DMAE.

La DMAE se ha descrito como una pérdida de la homeostasis ocular que se produce con el envejecimiento, y al que se suman el declive de la función mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación crónica, el desequilibrio entre factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos así como determinados factores de riesgo ambientales y genéticos.¹⁴

Las secuencia precisa de las señales moleculares que preceden a la neovascularización en la DMAE, no es claramente conocida. Sin embargo, la llave para determinar el inmediato desarrollo y el mantenimiento de la neovascularización, así como la vía final de desarrollo de la enfermedad parece estar mediado por el factor proangiogénico VEGF.

La familia VEGF consta de 5 glicoproteínas: VEGF-A, B, C, D y factor de crecimiento placentario. Parece que el VEGF-A es la que desencadena el papel fundamental en la patogénesis de la DMAE exudativa. Esta glicoproteína se une a tres receptores celulares tirosinasa: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3, que presentan actividad enzimática intrínseca y desencadenan una cascada interna de reacciones que propician la migración y proliferación celular.

Se sabe que el VEGF, factor proangiogénico generado ante situaciones de hipoxia, juega un papel fundamental y necesario como desencadenante de la migración vascular, así como del aumento de la permeabilidad de las células endoteliales de los complejos neoformados que aparecen en la DMAE avanzada neovascular, con el objetivo de suministrar nutrientes a la retina. Además encargadas de liberar determinados compuestos para degradar la membrana basal de las células endoteliales haciendo que se extravasen leucocitos, activando la respuesta inflamatoria y la proliferación celular.¹⁵

Actuando frente a esta diana terapéutica, los agentes anti-VEGF producen una rápida e importante reducción de todos tipos de fluidos retinianos (intrarretiniano o subretiniano) así como del engrosamiento

retiniano a nivel macular medido mediante OCT, conduciendo a la reducción de la permeabilidad vascular, estabilización de la lesión neovascular y una mejoría en la AV.¹⁶

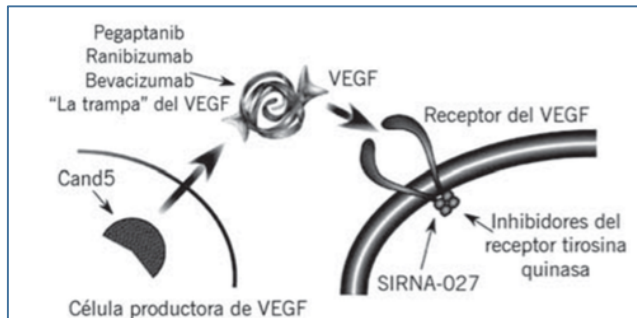


Figura 6. Mecanismo de acción de los fármacos anti-VEGF. Imagen obtenida de Kaiser PK and cols. Antivascular Endothelial Growth Factor Agents and Their Development: Therapeutic Implications in Ocular Diseases. Am J Ophthalmol. Elsevier; 2006 Oct;142(4):660-668.e1.

Pegaptanib (Macugen®, Pfizer Manufacturing Belgium NV), aptámero selectivo para VEGF-A165, fue el primer fármaco anti-VEGF aprobado en 2004 para el tratamiento de la DMAE exudativa.¹⁷ A pesar de los modestos resultados en el enlentecimiento de la pérdida visual en este tipo de pacientes, supuso una revolución en la terapia de esta enfermedad pues significaba una diana específica en la neovascularización de la DMAE, a diferencia de la terapia fotodinámica con verteporfino o el láser de argón utilizado hasta ese momento; así como la demostración de la tolerancia de múltiples inyecciones intravítreas en estos pacientes y la ausencia de necesidad de la repetición de angiografías con fluoresceína, pues suponía el mismo tratamiento para todos los subtipos neovasculares. Posteriormente bevacizumab (Avastin®, Genentech, South San Francisco, CA), anticuerpo monoclonal humanizado recombinante contra todas las isoformas del VEGF-A y aprobado para distintas indicaciones oncológicas, comenzó a utilizarse fuera de dicha indicación en la población con DMAE exudativa demostrando importantes mejorías visuales.¹⁸

Los más utilizados hoy en día y recomendados por las guías de práctica clínica son Ranibizumab (Lucentis®, Novartis), del que hablaremos a continuación, que se diseñó para tener una semivida sistémica más corta, una mayor afinidad de unión a las isoformas del VEGF, mejor penetración en la retina (al tener menor peso molecular) y menor capacidad inflamatoria que bevacizumab.¹⁹ Y posteriormente Aflibercept (Eylea®, Bayer), proteína de fusión VEGF-Trap-eye cuya fracción variable es construida con partes de VEGF1 y 2, capaz de inhibir la fracción VEGF-A, VEGF-B y el factor de crecimiento placentario.

Ranibizumab en DMAE.

Ranibizumab constituye un fragmento de anticuerpo monoclonal recombinante humanizado (Fab) dirigido contra el VEGF-A y aprobado para el tratamiento de la DMAE exudativa.

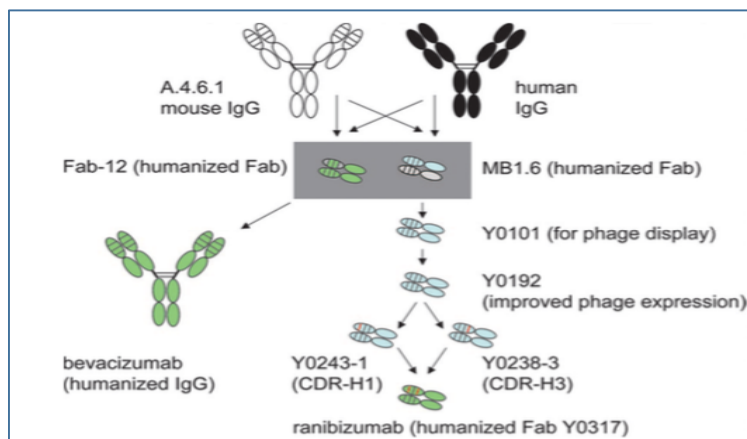


Figura 7. Síntesis de bevacizumab y ranibizumab: pasos en su síntesis. A partir del clon híbrido de ratón A.4.6.1. Se observan las cadenas de DNA recombinante usadas para construir los genes que corresponden a la inmunoglobulina G o a los distintos anticuerpos de la forma Fab. El proceso de selección incluye dos variantes con afinidad independiente Y0243-1 y Y0238-3. Para generar el producto final: ranibizumab, fueron introducidos aminoácidos combinados e introducidos en el contenido Fab-12 (variante Fab de bevacizumab). Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina*. 2006 Oct;26(8):859–70.

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

Los estudios Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of wetAMD, (MARINA)²⁰ y Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD, (ANCHOR)²¹ tenían como objetivos principales: identificar la proporción de pacientes que perdían menos de 15 letras ETDRS desde la visita inicial. Se diferenciaban membranas neovasculares al menos 50% o más con componente clásico en el caso de ANCHOR, y en el caso de MARINA con membranas mínimamente clásicas u ocultas. Ambos estudios se realizaron en monoterapia con Ranibizumab y mostraron la eficacia de ranibizumab en inyecciones mensuales, mostrando ganancias a 12 meses de 6,5 a 7,2 letras ETDRS en MARINA y de 8,5 a 11,3 letras ETDRS en ANCHOR, así como una mejoría del espesor retiniano central. Según los resultados obtenidos en estos estudios, el empleo de tres inyecciones consecutivas de ranibizumab cada 4 semanas permitía obtener el mejor resultado en términos de mejoría de la agudeza visual, aplanándose la curva de evolución de la misma a partir de ese momento.

Estos ensayos fueron los primeros que nos ofrecieron resultados de ganancia neta de visión, abandonando conceptos como “ganancias relativas” o “estabilidad” para referirse a pérdidas funcionales menos marcadas. Las conclusiones de dichos trabajos constituyeron un punto de inflexión en el manejo de la DMAE exudativa, tanto por los resultados clínicos, como por la confirmación de que esta enfermedad era crónica y precisaba de tratamiento intensivo para conseguir mejorías visuales.

Sin embargo, el reto a partir de este momento ha pasado a ser la búsqueda de una estrategia sostenible, pues el tratamiento mensual constituye una carga insostenible en la práctica clínica, en visitas e inyecciones, tanto para el paciente como para el sistema sanitario y, en muchos casos, conlleva sobretratar al paciente al no adaptar el régimen de tratamiento a la actividad exudativa.

En 2010 Ophthalmology publica el estudio EXCITE,²² que intenta demostrar que los resultados con tratamiento trimestral no eran inferiores al régimen mensual con un seguimiento de doce meses. Se demostró que tras tres inyecciones mensuales de ranibizumab, las terapias trimestrales mantenían la AV en pacientes con neovascularización secundaria a la DMAE durante el tratamiento de 12 meses, disminuyendo el número de inyecciones, si bien no se cumplía la no inferioridad pues la diferencia en la AV no era de más de cinco letras.

El estudio PrONTO²³ se diseñó para buscar otras alternativas de tratamiento que no implicaran pautas fijas, otorgando cierta flexibilidad a los médicos para personalizar la atención e individualizar la enfermedad. Concluyó que el tratamiento con ranibizumab, guiado mediante OCT con un régimen variable según necesidad, permite obtener resultados comparables en términos de AV y con un número de inyecciones inferior al de otros estudios con tratamiento mensual de ranibizumab. En este estudio, se administraron 3 inyecciones de carga y seguimiento mensual a todos los pacientes a partir de entonces, con retratamiento en caso de que ciertos criterios preestablecidos se cumplieran (denominado PRN o *pro re nata*, a demanda): si la AV caía más de cinco letras con líquido en mácula por OCT, aumento del grosor retiniano al menos de 100 µm, NVC clásica de nueva aparición, nueva hemorragia o líquido macular en el OCT al menos un mes postinyección. Este estudio fue pionero en introducir el retratamiento en base a los hallazgos obtenidos en la OCT. A los 24 meses, la AV media mejoró en 11 letras y un 43% de los pacientes ganaron 15 o más letras, con un promedio de 9,9 inyecciones.

Debido a las limitaciones del PrONTO en cuanto a tamaño muestral y a la ausencia de grupo control, se publica el estudio Europeo y Australiano SUBSTAIN,²⁴ con una dosis de carga de tres inyecciones consecutivas mensuales y pauta PRN, diseñado para analizar la seguridad, tolerabilidad y eficacia del Ranibizumab 0,3 mg inicialmente (el 88% recibieron esta dosis de carga) y luego

se inyectaron 0,5 mg, en régimen PRN tras las tres dosis de carga durante un año de seguimiento. El retratamiento se basaba en la pérdida de cinco letras o más o en un aumento del grosor retiniano macular de 100 o más micras. Sin embargo existió una opción para no tratar con Ranibizumab cuando la AV fuera > de 79 letras o si el grosor central de la retina fuera < 225 micras. Los resultados pusieron de manifiesto que, tras las tres dosis de carga, la ganancia fue de 5,8 letras y, tras un año con este régimen de tratamiento, la ganancia fue de 3,6 letras, recibiendo aproximadamente 2/3 de inyecciones que con el tratamiento mensual. La OCT fue también de gran ayuda al demostrar la estabilización del grosor central de la retina, existiendo una diferencia entre el mes 3 y el 12 de escasamente 10 micras. Este régimen se demostró no inferior al mensual, con menor número de inyecciones y sin pérdida de eficacia.²⁵⁻²⁸ A partir de entonces se introduce de manera protocolizada la valoración tanto cualitativa como cuantitativa mediante la OCT para el diagnóstico y tratamiento de ésta enfermedad.

Estos estudios sentaron las bases del llamado régimen PRN en el que se administra tratamiento si se observa actividad de la lesión. No obstante, para alcanzar un buen resultado clínico es obligatorio realizar una estricta monitorización mensual sin ninguna tolerancia a la presencia de líquido macular detectado en la OCT, tal y como se demostró en HARBOR²⁹ y CATT²⁵. En este estudio también se demostró que los pacientes que recibieron inyecciones mensuales durante el primer año y se les reafeccionó al tratamiento PRN durante el segundo año obtuvieron resultados de AV similares a los de los pacientes tratados con un régimen PRN desde el inicio.

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes estudios con ranibizumab en el 'práctica clínica real'. La mayoría de ellos están basados en el régimen PRN, pero con criterios más flexibles que en los ensayos clínicos para

reducir la carga de inyecciones y visitas de seguimiento. Sin embargo, los resultados globales de estos estudios no son tan buenos como los que se obtuvieron siguiendo los protocolos más rígidos de ensayos clínicos. Los regímenes PRN realizados fuera de los ensayos clínicos tienen numerosas fuentes para un posible incumplimiento.

Por otro lado, han aparecido los regímenes de “tratar y extender” (“treat and extend”) que amplian progresivamente los intervalos entre las inyecciones si no hay líquido. Por tanto, se ajusta el intervalo máximo sin tratamiento y los pacientes son tratados independientemente de la presencia de líquido o actividad neovascular, tratando de anticiparse a las recidivas.

Factores de riesgo en DMAE.

Con la edad, se producen múltiples cambios morfológicos en las diversas estructuras oculares como son: aumento de productos de desecho en el EPR, tales como la lipofuscina y la formación de drusas (generadas a partir del ciclo visual de los fotorreceptores); un aumento de la rigidez de la membrana de Bruch (motivado principalmente por cambios en el componente de colágeno, con la consiguiente dificultad para el paso de moléculas a través de la misma); o una disminución del flujo y del calibre de los vasos de la coriocapilar³⁰. Muchos de estos hallazgos pueden observarse en ojos envejecidos, pero también se ven en pacientes con DMAE. No obstante, no todos los ojos envejecidos desarrollarán DMAE.¹⁴

La influencia de la edad en el desarrollo de la enfermedad parece clara y se considera el factor de riesgo más fuertemente asociado con la enfermedad^{31,32} (figura 4).

Prevalence of AMD by Age (% of age-specific population)			
Age	Geographic atrophy	Neovascular AMD	Any Late AMD
<55	0.08 (0-0.15)	0.14 (0-0.28)	0.2 (0-0.39)
55-64	0.25 (0.04-0.47)	0.37 (0.09-0.65)	0.25 (0.13-0.38)
65-74	1.37 (0.17-2.57)	0.68 (0.3-1.05)	1.62 (0.67-2.57)
75-84	2.25 (1.26-3.24)	2.52 (1.7-3.33)	4.93 (3.19-6.67)
85+	7.54 (3.31-11.77)	8.49 (5.41-11.57)	14.47 (11.57-17.36)
All Ages	0.63 (0.44-0.81)	0.96 (0.72-1.2)	1.64 (1.47-1.81)

Tabla 1. Prevalencia de la DMAE según la edad. Tabla obtenida a partir de Friedman DS y cols. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. Arch Ophthalmol. 2004 Apr; 122(4):564-72.

Sin embargo, existen otros factores demográficos como la raza caucásica o el género femenino, el tabaquismo, la dieta rica en grasas saturadas, factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, dislipemia, diabetes

mellitus o tabaquismo) que, en sujetos con cierta predisposición genética, pueden conllevar a que los cambios propios de la edad, actúen como sustrato para el desarrollo de la enfermedad.^{2,14}

La contribución genética al desarrollo de la DMAE es incuestionable y se deduce tanto de análisis epidemiológicos como de estudios en gemelos y de mapeo genético.

A principios del año 2016, se encontraron más de 52 genes localizados en 34 locus diferentes vinculados a la DMAE.³³ Estos genes desempeñan su papel en la respuesta inmune innata, en la vía del complemento, el estrés oxidativo, procesos inflamatorios, en la homeostasis retiniana, en la angiogénesis y en la respuesta al tratamiento, por lo que el grado de disfunción de estas reacciones en individuos con DMAE se ha atribuido a las variaciones encontradas en dichos loci. Algunos de los genes más investigados son el factor H del complemento (CHF) en el cromosoma 1 y 10 y CFB/C2 en el cromosoma 6.³⁴ También se han asociado variantes que incluyen polimorfismos en la lipasa C hepática,³⁵ en TLR3 (receptor 3 toll-like)³⁶ o en TIMP3 inhibidor de metaloproteinas de la matriz³⁷. En la tabla 2 se pueden observar algunos de los múltiples genes implicados y su asociación en la DMAE.

Genes relacionados con el sistema inmune	Genes relacionados con la neovascularización	Genes relacionados con lipoproteínas	Polimorfismos genéticos que afectan a la terapia antiVEGF	Loci relacionados con DMAE	
CFH, CFHR1, CFHR3, CFB, CFD, C2, C3, C5, ARMS2/2, HTRA1, EFEMP1, Hemicentin-1	VEGF, TIMP-2, Fibulin-5	LIPC, APOE, CETP, CDR36	VEGF, VEGFR, CFH, C3, ARMS2/HTRA1, PLAG12A	Adamts9, COL5A1-FILIPIL, IER3-DDR1, SLC16A8, RAD51, RAD51B, FRK/Col10A1, CACNG3, MYRIP, Skiv2L	IGFR1, REST-C4/F14-PolR2B-IGFBP7, SCARB1, SerpinG1, TNFRSF10A, CCL2, Cx3CR1, ERCC6, PSCN2.

Tabla 2. Factores genéticos asociados con DMAE. Tabla basada en Lambert NG y cols. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration.

DOI: 10.1155/2016/15461402

Sin embargo, el papel que juega la predisposición genética se extiende más allá de la mayor susceptibilidad de un individuo a desarrollar DMAE, pues también puede afectar la respuesta al tratamiento. Smailhodzic y cols.³⁸ demostraron un efecto acumulativo de alelos de alto riesgo en CHF, ARMS2 y VEGFA, que se asociaron a una respuesta inadecuada a los agentes antiVEGF.

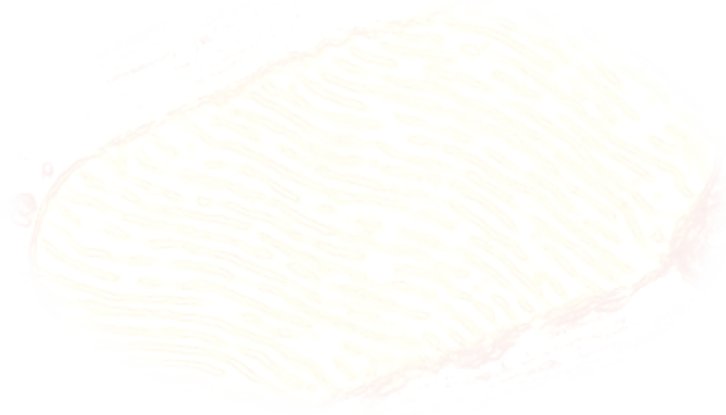
Por su parte, Medina y cols.³⁹ también observaron que en individuos homocigotos CC, las variantes del polimorfismo del gen CHF T1277C se asociaron con una respuesta morfológica y funcional retardada al tratamiento con anti-VEGF sugiriendo que los antecedentes genéticos del individuo podrían ayudar a optimizar la respuesta al tratamiento.³³

Sin embargo, no sólo el DNA nuclear se ha asociado a esta enfermedad. La evidencia avala que variaciones genéticas en el DNA mitocondrial (mtDNA); en concreto, determinados haplogrupos de mtDNA contribuyen a una determinada susceptibilidad frente a la DMAE.

Muchos estudios han asociado alteraciones en el EPR, drusas y predisposición a padecer DMAE con determinados haplogrupos de mtDNA. Jones y cols.,⁴⁰ en una población australiana, encontraron asociaciones significativas entre el haplogrupo H -el más frecuente de Europa- y una reducida prevalencia de padecer DMAE, así como un menor riesgo de drusas blandas. No obstante, los pacientes con haplogrupo J mostraron una probabilidad superior al 80% de padecer drusas que el resto de haplogrupos. Los individuos con haplogrupo U tuvieron una significación estadística para padecer alteraciones en el EPR, encontrando que todas estas asociaciones eran independientes de la edad, el sexo o el tabaquismo, concluyendo que el mtDNA podía alterar la susceptibilidad a padecer DMAE. Canter y cols.⁴¹ encontraron un riesgo aumentado de padecer DMAE en haplogrupos T. Un año más tarde, Udar y cols.⁴² concluyeron que los haplogrupos J, T y U de mtDNA se asociaban a una reducida producción de ATP y esto les confería un riesgo incrementado de desarrollar DMAE. Estos autores hipotetizan que estas deficiencias subclínicas

en el sistema OXPHOS asociadas con los haplogrupos H, T y U son exacerbadas por la acumulación de daño somático en el mtDNA relacionado con la edad. Además discuten sobre si este sistema OXPHOS dañado, produciría un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conllevarían mayor disfunción en el mtDNA. Mueller y cols.⁴³ informaron una mayor prevalencia de DMAE neovascular en los haplogrupos J y T, mientras que el haplogrupo H constituía un factor protector en la población caucásica. Reforzando la idea de la existencia de una asociación entre los haplogrupos mitocondriales y la neovascularización de la DMAE así como la necesidad de mayor número de estudios en esa línea de investigación. Kenney y cols.,⁴⁴ en 2013, confirmaron estos resultados en una población caucásica del norte de Europa, afirmando que los haplogrupos JT, asociaban mayor riesgo de desarrollar DMAE, considerándolos como factores de riesgo para la misma, y que el haplogrupo H, debía definirse como factor protector. Y concluyeron, que existe cada vez mayor evidencia científica que avale como la disfunción mitocondrial juega un papel importante en el desarrollo y progresión de la DMAE.





MITOCONDRIA, HAPLOGRUPOS DE mtDNA Y SISTEMA OXPHOS EN DMAE.



2. MITOCONDRIA, HAPLOGRUPOS DE mtDNA Y SISTEMA OXPPOS EN DMAE.

La mitocondria es una organela intracelular localizada en el citoplasma de las células eucariotas. Una de las principales particularidades es que posee su propio genoma independiente del DNA nuclear (nDNA) compuesto por 16569 pares de bases que contienen información para 37 genes. Todas las proteínas que codifica el mtDNA, forman parte del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), que se localiza en la membrana interna de la mitocondria. Dicho sistema está compuesto por la cadena respiratoria y la ATP sintasa, uno de cuyos objetivos fundamentales es la producción de ATP para la supervivencia celular siendo este sistema la principal fuente de producción de ATP.

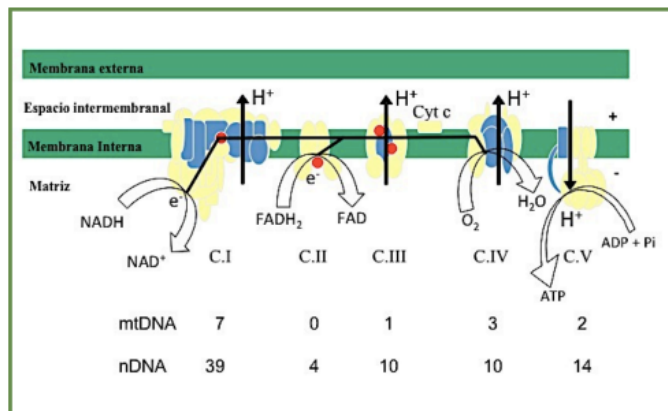


Figura 8. Sistema de fosforilación Oxidativa y mitocondria. En azul se representan las subunidades codificadas en el DNA mitocondrial y en amarillo las codificadas en el DNA nuclear. Los puntos rojos: coenzima Q. C.I a V: Complejos del I al V. En la parte inferior el número de subunidades codificadas en uno u otro genoma. Imagen tomada de Las enfermedades raras en las patologías neurometabólicas. Montoya J, Arenas J, Ruiz-Pesini E, Martín-Casanueva MA. Noviembre 2018. Arbor 194 (789):461.

En este proceso, como subproducto de la fosforilación oxidativa, se generan la mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS) de la mitocondria, representando el orgánulo celular que más cantidad genera.⁴⁵ Cuando la cadena respiratoria funciona correctamente, la producción de estos radicales libres representa un bajo porcentaje y se consideran moléculas señal entre la mitocondria y el núcleo celular.⁴⁶ Pero si la producción de radicales libres es excesiva por disfunción del sistema, los mecanismos de protección son insuficientes y se genera estrés oxidativo mitocondrial, tanto a nivel del mtDNA como de los lípidos de membrana y proteínas mitocondriales. Este mtDNA es particularmente sensible a los ROS, ya que no dispone de la protección de determinados sistemas de reparación que sí posee nDNA. La producción excesiva de ROS ha sido descrita como promotora del depósito de proteínas oxidadas en la membrana de Bruch, factor de riesgo para desarrollo de DMAE⁴⁷ y de la liberación de factores pro-angiogénicos como VEGF-A.^{48,49} En este sentido, se ha observado como diferentes oxidoácidos que se metabolizan a través del sistema OXPHOS pueden intervenir en la estimulación de la expresión VEGF.⁵⁰

Este mtDNA concentra un número estable de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) en regiones codificantes que definen los llamados Haplogrupos del mtDNA. Estos describen grupos de genotipos de mtDNA relacionados filogenéticamente. Así pues, los orígenes geográficos de la población mundial pueden ser clasificados por líneas maternas de acuerdo con estos SNPs llamados haplogrupos. El haplogrupo más antiguo que proviene de África ha evolucionado desde hace miles de años. El haplogrupo H es el más común en Europa. Siendo los haplogrupos J, U y V los que tienen presencia moderada en esta población. Sin embargo, el haplogrupo J es originario del norte de Europa mientras que el haplogrupo H lo es del sur de Europa.

Estos haplogrupos de mtDNA, tienen propiedades bioenergéticas diferentes y, según requiera la población para satisfacer las necesidades de su

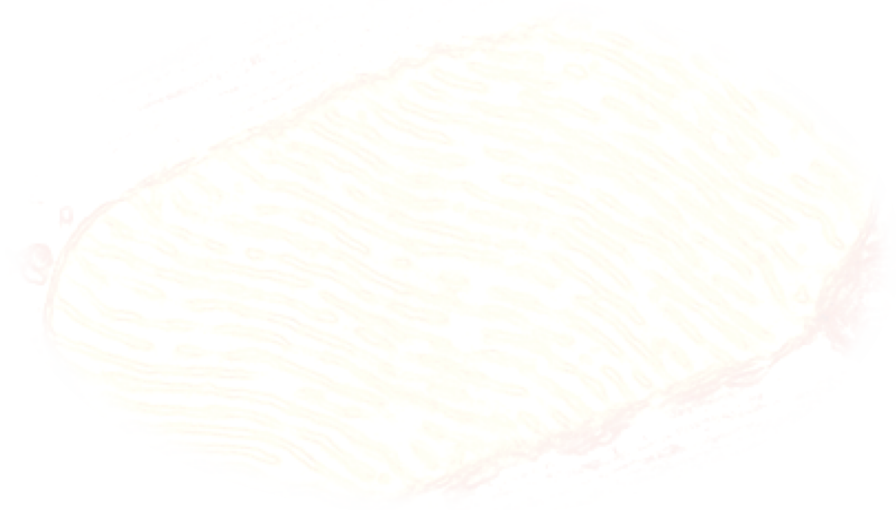
entorno geográfico, pueden tener diversos efectos biológicos sobre sus células: diferente eficiencia del sistema OXPHOS, producción de ATP, génesis de ROS, apoptosis y niveles de muerte celular.

Kenney y cols. desarrollaron un modelo híbrido humano de células del EPR (híbrido citoplasmático) que comparten el mismo nDNA y sólo difieren en su mtDNA, atribuyendo las diferencias encontradas al segundo. Demostraron cómo los híbridos con el haplogrupo mitocondrial H tenían niveles más altos de producción de ATP, indicando que utilizaban más efectivamente el sistema OXPHOS que los híbridos J.⁴⁴ Un año más tarde, no sólo comprobaron que los híbridos J tenían niveles más bajos de ATP, sino que mostraban tasas más bajas de expresión de siete de los genes de los complejos respiratorios codificados por el mtDNA.⁵¹

Por otro lado, existe evidencia en la literatura que asocia alteraciones en el mtDNA y la DMAE. Se ha visto que existe un daño oxidativo en el mtDNA (grados de heteroplasmia patológica, deleciones y sustituciones en los nucleótidos) mayor en pacientes con DMAE que en controles sanos.⁵² Incluso se ha informado una correlación positiva entre la extensión del daño del mtDNA y el grado de afectación de la DMAE.⁵³ Asimismo, se ha correlacionado la disminución en el número y el área de las mitocondrias en el EPR con el envejecimiento, estando significativamente disminuidos en los pacientes con DMAE.⁵⁴

Diferentes autores concluyen que las alteraciones mitocondriales tendría un significativo impacto en la producción de ATP, motivando alteraciones bioenergética en las células del EPR -cuyo metabolismo y consumo de oxígeno es de los más elevados del organismo⁴⁶- y que esto tendría su importancia en la patogénesis de enfermedades como la DMAE.





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

Hipótesis

La DMAE constituye la primera causa de ceguera en los países industrializados en personas mayores de 60 años y, dada su relación con el proceso de envejecimiento, en los próximos años se prevé un gran aumento de su incidencia.

Los fármacos anti-VEGF, entre los que figura el ranibizumab, constituyen en la actualidad el tratamiento de elección para esta patología. Sin embargo, la respuesta a esta terapia no es homogénea, por lo que se han buscado diferentes factores clínicos y/o genéticos que nos ayuden a dirigir el tratamiento de forma más personalizada, evitando el sobre/infra tratamiento, así como a predecir la evolución de la enfermedad.

Si algunos haplogrupos de mtDNA han sido asociados a la DMAE neovascular como marcadores de “riesgo genético” indicativos de una susceptibilidad individual a padecer dicha patología, nuestra hipótesis plantea si estos haplogrupos de mtDNA con diferentes características bioenergéticas podrían conferir también a los pacientes distintas capacidades de respuesta a la terapia antiangiogénica intravítrea con ranibizumab.

Objetivos

Objetivo principal: la búsqueda de un marcador genético (de DNA mitocondrial) que permita predecir la respuesta a la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes con DMAE avanzada neovascular.

Objetivos secundarios:

- 1- Caracterizar el haplogrupo de mtDNA de los pacientes afectados de DMAE neovascular en nuestra área de población.
- 2- Estudio de las características clínicas de la DMAE en función de los haplogrupos de mtDNA.
- 3- Establecer la eficacia de la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes afectados de DMAE neovascular naïve durante un año de régimen PRN en práctica clínica real.
- 4- Estudio y caracterización de los factores que han influido en la evolución y respuesta al tratamiento de nuestros pacientes.
- 5- Establecer una relación entre ambas variables: respuesta al tratamiento y haplogrupo de mtDNA.



MATERIAL Y MÉTODO



4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Diseño de Estudio.

Se trata de un estudio observacional y ambispectivo realizado en el Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” (HCULB) de Zaragoza, junto con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, para evaluar la influencia del haplogrupo de mtDNA en la respuesta al tratamiento con Ranibizumab (Lucentis®) en pacientes con DMAE avanzada.

El reclutamiento se llevó a cabo entre los meses de enero de 2009 y enero de 2011 en la Unidad de Retina del citado hospital en pacientes diagnosticados de neovascularización coroidea-*naive* secundaria a un proceso de DMAE exudativa y tratados mediante Ranibizumab (Lucentis®) intravitreo en dosis de 0,5 mg/0,05 ml. de acuerdo a el protocolo de tratamiento consistente en una dosis de carga de tres inyecciones mensuales (una cada 4 semanas) seguidas de un régimen de tratamiento PRN (tratamiento a demanda en función de la evolución de la enfermedad), prolongándose el periodo de seguimiento de hasta las 52 semanas desde el inicio del tratamiento.

La elección del medicamento empleado para su tratamiento y el protocolo de administración del mismo no se vieron influenciados por la realización del estudio. La forma de utilizar ranibizumab y sus indicaciones estuvieron dentro de la práctica considerada habitual en ese momento para dicho fármaco y siguiendo el protocolo vigente en el HCULB de Zaragoza.

Tras recibir información completa y detallada, todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para la participación en el mismo. El estudio se llevó a cabo según los principios éticos de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (CEICA).

4.2 Materiales y recursos utilizados.

El presente estudio clínico se ha sido realizado en el Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” (HCULB) de Zaragoza, utilizándose las estancias, personal, equipos y materiales de los que disponemos en el área de consultas externas, quirófano local y Servicio de Farmacia del centro.

• Recursos humanos:

- Médicos oftalmólogos especializados de la Unidad de Retina del HCULB.
- Enfermeras y auxiliares de enfermería, tanto de consultas como del quirófano de Oftalmología del HCULB.
- Farmacéuticos del HCULB.

• Equipos e instrumental:

- Equipos para el examen oftalmológico:
 - * Proyector de optotipos ETDRS, con tubos fluorescentes fenestrados y con una luminancia adecuada a las normativas para el registro de agudeza visual en ensayos clínicos.
 - * Biomicroscopio con lámpara de hendidura para la exploración oftalmológica.
 - * Lentes de aumento de no contacto de 20, 78 y 90 dioptrías (Volk, Mentor, Ohio, EEUU) para la exploración biomicroscópica de fondo de ojo.
 - * Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD-OCT) y angiografía fluoresceínica (Heidelberg Engineering, Alemania).
- Equipos, material fungible e instrumental de cirugía para realizar las inyecciones intravitreas bajo condiciones de asepsia.

• **Reactivos y fármacos:**

- Examen oftalmológico: colirio de tropicamida al 1 % (Colircusi tropicamida®, colirio en solución 10 mg/ml, Alcon Cusi S.A; El Masnou, España).
- Inyección intravítrea: povidona yodada (Betadine, Asta Medica S.A; Merignac, Francia), tetracaína (Colircusi anestésico doble, Alcon Cusi S.A; El Masnou, España) y ranibizumab (Lucentis® 0,5 mg/0,05 ml. Novartis. España).

4.3 Sujetos.

Pacientes pertenecientes al sector sanitario Zaragoza III diagnosticados de DMAE avanzada de tipo neovascular y tratados en el Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” o remitidos a este centro para su tratamiento.

Se incluyeron en el estudio 98 ojos correspondientes a 91 pacientes diagnosticados o tratados de DMAE neovascular y que cumplieran criterios de inclusión, durante el periodo de enero de 2009 a diciembre de 2010.

El análisis de los datos se realizó de forma retrospectiva tras un año de seguimiento (con visita final a las 52 semanas).

4.4 Criterios de inclusión.

1. Pacientes con diagnóstico clínico de DMAE de tipo neovascular *naïve* que fueron tratados con ranibizumab en dosis de carga y seguida de una pauta PRN en el HCULB de Zaragoza siguiendo el mismo protocolo.
2. Sujetos incluidos en la base de datos de haplogrupos mitocondriales del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.
3. Agudeza visual superior a 24 letras en optotipo ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study).
4. Edad superior a 55 años.
5. Obtención del consentimiento informado.

4.5 Criterios de exclusión.

1. DMAE en estadios iniciales (alteraciones del EPR, drusas blandas,...) que no hayan desarrollado neovascularización coroidea.
2. DMAE en fase disciforme (donde no se pueda asegurar el carácter neovascular o húmedo de la misma).
3. DMAE con atrofia geográfica.
4. Neovascularización coroidea secundaria a otras causas.
5. Inyección previa de otros agentes antiVEGF.
6. Tratamiento previo con Terapia Fotodinámica.
7. Existencia de otra patología retiniana que imposibilite la diferenciación de los resultados anatómicos y funcionales secundarios propiamente a la DMAE (retinopatía diabética, patología de la interfase vitreoretiniana, desgarro del epitelio pigmentado de la retina, membrana epirretiniana, agujero macular...)
8. Existencia de otra patología oftalmológica que imposibilite la veracidad de los datos recogidos:
 - Leucomas corneales, catarata; afaquia.
 - Uveitis, glaucoma no controlado, hemovítreo.
 - Antecedentes quirúrgico de vitrectomía o desprendimiento de retina.
9. Absentismo en la consulta: la no comparecencia a todas las revisiones mensuales previstas y programadas tras la dosis de carga durante el primer año.

4.6 Protocolo y parámetros de estudio.

Se registraron los siguientes datos:

o Fecha de nacimiento

o Género

o Factores de riesgo: HTA, Diabetes Mellitus, Tabaquismo y Dislipemia

o Antecedentes oftalmológicos.

o Agudeza visual:

Agudeza visual (AV) con la mejor corrección óptica, mediante optotipos ETDRS a 4 metros, obtenida por un oftalmólogo empleando una tarjeta de lectura ETDRS dentro de una caja con retroiluminación de medidas 62,9 cm x 65,4 cm x 17,8 cm, situada a una altura de 125 cm del suelo, en el interior de una habitación en penumbra. La mejor agudeza visual corregida (MAVC) se obtuvo de la historia clínica mediante una puntuación en letras de agudeza visual medidas.

o Presión intraocular (PIO), registrada mediante tonometría de aplanación de Goldmann (en mmHg)

o Biomicroscopía del segmento anterior

o Oftalmoscopia indirecta: Presencia / ausencia de hallazgos fundoscópicos sugestivos de DMAE exudativa como drusas (duras, blandas, pseudodrusas reticulares); hemorragias retinianas y/o presencia de atrofia geográfica y/o cicatriz disciforme.

o Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral: Spectral-Domain-OCT (Spectralis SD-OCT. Heidelberg.):

1- Se seleccionó el protocolo de análisis de mapa macular ETDRS de grosor de retina (6x6mm), obteniendo 9 subcampos:

-El grosor del subcampo foveal central (GFC): espesor medio de todos los puntos dentro del círculo interno de 1 mm de diámetro.

-El grosor macular (GM) generado como sumatorio de la medida en micras de los nueve subcampos: el foveal y los ocho regiones concéntricas al GFC de la rejilla del ETDRS medidos a 1, 3 y 6 mm.

- Segmentos internos y externos concéntricos de rejilla de ETDRS medidos a 1, 3 y 6 mm del GFC.

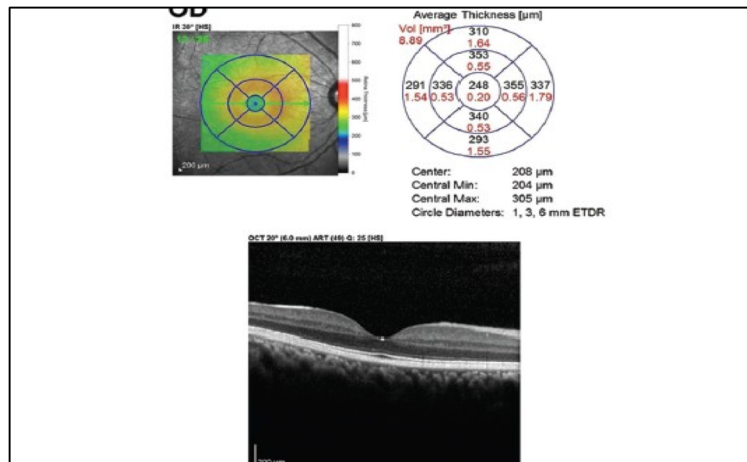


Figura 9. Tomografía de coherencia óptica macular de dominio espectral (SD-OCT). Diagrama con las 9 regiones del mapa macular ETDRS. Los círculos concéntricos son de 1 mm, 3 mm y 6 mm de diámetro (Grosor foveal central, superior interno, TIM: Segmento Macular Interno Temporal; SIM: Segmento Macular Interno Superior; NIM: Segmento Macular Interno Nasal; IIM: Segmento Macular Interno Inferior; TEM; Segmento Macular Externo Temporal; SEM: Segmento Macular externo Superior; NEM: Segmento macular Externo Nasal; IEM: Segmento Macular externo Inferior).

2- Clasificación del complejo neovascular y localización del mismo:

Neovascularización tipo 1: aquella localizada bajo del EPR sin signos de infiltración de la proliferación fibrovascular hacia el espacio subretiniano

Neovascularización tipo 2: aquella localizada en el espacio subretiniano, por encima de un EPR lesionado e invadido por la proliferación fibrovascular.

Neovascularización tipo 3: se corresponde con la proliferación angiomasosa retiniana (RAP), cuyos hallazgos tomográficos incluyen la presencia de desprendimiento seroso del EPR con edema retiniano quístico asociado o no a fluido subretiniano y su confirmación en algunos casos con AGF.

3- Parámetros de exudación activa mediante OCT:

líquido intrarretiniano (LIR), líquido subretiniano (LSR), desprendimiento del epitelio pigmentario (DEP), desarrollo de fibrosis o cicatriz disciforme.

o Angiografía con fluoresceína (AGF) en los casos que se requiera realizar diagnóstico diferencial con otras patologías en la visita basal. Para la angiografía con contraste se ha utilizado en todas las ocasiones un angiógrafo Spectralis HRA (Heidelberg Engineering).

En lesiones mínimamente clásicas u ocultas en la AGF se efectúa una AVI permitiendo el diagnóstico diferencial con otras dos entidades: la proliferación angiomasosa retiniana (RAP), definida por la presencia de una lesión de posible origen intrarretiniano que crece en el espesor de la retina neurosensorial con tendencia a desarrollarse hacia coroides; y la vasculopatía coroidea polipoidea (VCP), definida por la presencia de una red vascular coroidea cuyos vasos terminan en forma de dilataciones polipoideas .

Tras la visita basal, la angiografía se realizó ante la presencia de un empeoramiento de la agudeza visual no explicable mediante la OCT, en casos de aparente ausencia de respuesta, o ante una dudosa reactivación de la enfermedad. En caso de evidente fuga angiográfica, se indica retratamiento con ranibizumab.

o Tratamiento:

Los pacientes fueron incluidos en el estudio entre 2009 y 2011, se siguió la pauta PRN establecida en el hospital en ese momento, y que estaba basada en las guías de la Sociedad Española de Retina y Vítreo (SERV), así como en las guías europeas de retina. Se consideraron como criterios para nueva inyección de ranibizumab al menos uno de los siguientes:

- Pérdida de agudeza visual de al menos 5 letras en la escala ETDRS
- Incremento del GFC de al menos 100 μ m o persistencia de fluido intra o subretiniano en la OCT.
- Nuevas hemorragias maculares o perimaculares.
- Evidencia de fuga angiográfica (en el caso en que se realizó de forma necesaria)

La pérdida de agudeza visual sin actividad en OCT no se consideró criterio de retratamiento per se, aunque hacía necesaria la realización de una angiografía para descartar una reactivación de la lesión.

-El fármaco usado para el tratamiento intravítreo fue ranibizumab (Lucentis®) en dosis de 0,5mg/0,05ml.

- Respecto al número de inyecciones administradas durante el primer año de tratamiento, en todos los casos la inyección intravítrea de ranibizumab se realizó siguiendo el mismo protocolo y las recomendaciones habituales.⁷⁶

En la sala de quirófano, se realiza una limpieza con povidona iodada de la región periocular, se coloca un blefarostato estéril entre los párpados, se marca el punto de inyección mediante un marcador rígido estéril en la esclerótica a 3,5 mm de limbo en pseudofáquicos y a 4 mm en fáquicos. La zona elegida para la inyección fue, preferentemente, el cuadrante inferotemporal. A continuación, se inyectaba ranibizumab (0,5 mg/0,05 ml), con una jeringa de insulina y una aguja de calibre 30g. Al terminar el procedimiento, se aplica una hemosteta sobre la zona de la inyección para evitar el reflujo subconjuntival del fármaco. Tras la inyección se comprueba la percepción de luz y se instila, de nuevo, povidona iodada diluida.

o Discontinuación del estudio:

El paciente pudo ser retirado del estudio al dejar de cumplir los criterios de inclusión o adquirir alguno de los criterios de exclusión.

o Toma de datos de la historia clínica:

• **En la visita basal, al diagnóstico:**

- Registro de la AV mediante optotipos ETDRS.
- Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 20 y 78 dioptrías de fondo de ojo.

- Realización de SD-OCT de 6 x 6 mm en el área macular.
- Realización de una AGF (\pm Verde de indocianina en caso de sospecha de VCP) en aquellos casos en los que se consideró necesaria.

• **En la visita a los 16 semanas:**

- Toma de AV mediante optotipos ETDRS.
- Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 78 D para fondo de ojo.
- Realización mediante SD-OCT de 6 x 6 mm del área macular.

• **En la visita a las 52 semanas:**

- Toma de AV mediante optotipos ETDRS.
- Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 20 y 78 dioptrías de fondo de ojo.
- Realización mediante SD-OCT de 6 x 6 mm del área macular.
- Obtención del número total de inyecciones intravitreas.

4.7 Análisis de DNA mitocondrial (mtDNA).

Se realizó, tras consentimiento informado del paciente, en el momento en el que fueron incluidos en el estudio, pudiendo realizarse al diagnóstico o durante el tratamiento en el periodo de seguimiento.

1. Reactivos:

Fenol IAC;TE (TRIS 20 mM pH 8, EDTA 5 mM); TBE (TRIS 54 g , Ac Borico 27,5 g , EDTA 20 0,5 M); SDS (25%) (w/v); Proteínasa K (20 mg/ml); *Reactivos Real Time-PCR*: TaqMan Master mix (Applied Biosystems), sonda Vic 0,2 mM, sonda Fam 0,2 mM, cebadores 0,9 mM de cada uno; *Reactivos PCR*: Agua destilada estéril,

dnTPs 200 μ M, Oligo H 2,5 μ M (Sigma), Oligo L 2,5 μ M (Sigma), Taq Roche 1,25 U (Roche), Buffer para Taq Roche 1x (Roche).

2.Extracción de DNA de la sangre y procesado.

Se extrajo el mtDNA de las 91 muestras de sangre de los pacientes incluidos en el estudio mediante el siguiente protocolo: se trasvasa la muestra de sangre desde los tubos de extracción a un tubo de centrifugar y se diluye hasta cuatro veces su volumen. Se centrifuga a 5000 rpm (centrifuga Cetrikon, rotor A8.24), durante 15 min a 4 °C. Se decanta el sobrenadante y se resuspende hasta aproximadamente 4 veces su volumen. Se vuelve a centrifugar en

idénticas condiciones. Se añaden 32 μ l de SDS (25%), para que quede al 0,4% en la disolución y se adicionan 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml), para que quede en la disolución a 200 μ g/ml. Se mezcla bien y se incuba a 37 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, se añade la décima parte del volumen (0,2-0,3 ml) de acetato amónico 7,5 M y se añade Fenol IAC hasta triplicar el volumen. Se centrifuga a 3000 rpm (Hermite Z200A rotor fijo Hermle 001/07, 220.97V01) durante 5 min a 20 °C.

Se recoge la fase acuosa (superior), y se trasfiere a un nuevo tubo de centrifuga y se repite la extracción con fenol. Una vez se ha extraído la fase acuosa por segunda vez, se realiza la misma operación, pero utilizando en vez de fenol, una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se añaden cantidades semejantes a las de fenol, es decir triplicar el volumen y se centrifuga en las mismas condiciones anteriores. Se recoge la fase acuosa (de nuevo la superior), se trasvasa a un tubo Corex y se añade el doble de volumen de etanol a -20 °C. Con unas suaves inversiones de muñeca, se hará precipitar el DNA.

Se forma ovillo de DNA, se recoge con una pipeta Pasteur y se transfiere a un Eppendorf con un pequeño volumen de Etanol. Se elimina el Etanol que sea posible y lo que quede se deja secar al aire. Se resuspende el DNA en 200 μ l de agua destilada estéril y se deja agitando en un termoblock para que se disuelva completamente.

3. Cuantificación de DNA

Para ello se utiliza el NANODROP ND-1000 Spectrophotometer que nos dará la medida de concentración, así como un cociente entre la cantidad de proteínas y el DNA, y los RNA y DNA.

4. Genotipado

Los polimorfismos que definen los haplogrupos H, V, U, J y T, que son los más frecuentes en la población española (85%), fueron determinados en todos los individuos mediante RT-PCR. Aquellos individuos que no fueron H, U o JT se separaron mediante la determinación del polimorfismo 14766 que define el haplogrupo HV. Los individuos HV y H se estudiarán conjuntamente. Seguidamente se caracterizaron los individuos de la línea JT mediante el polimorfismo en la posición 13708 y en aquellos no J se confirmó su pertenencia al haplogrupo T mediante PCR-RFLP (figura 6).

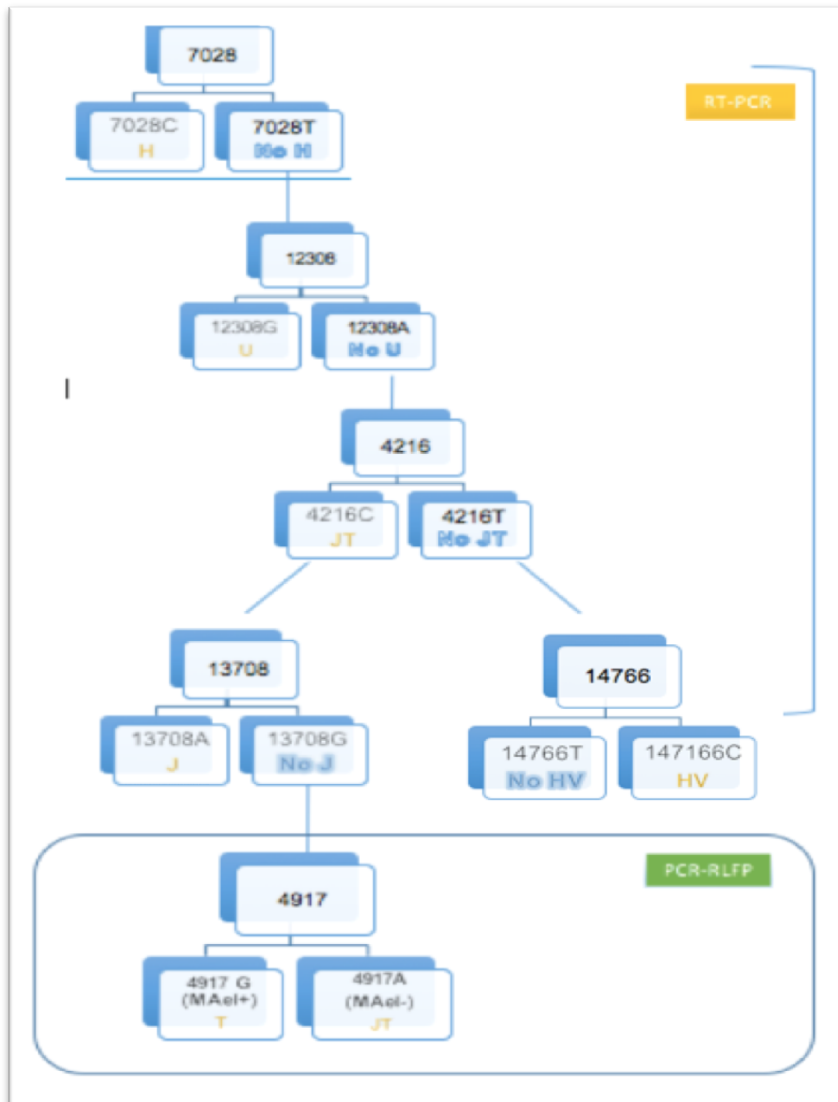


Figura 10. Estrategia de haplotipado.

5. Real Time – PCR

La determinación de haplogrupos de nuestro DNA se realizó por RT-PCR, utilizando reactivos TaqMan. Dicha técnica se basa en una determinación simultánea de cebadores específicos en torno a la posición 7028 y dos sondas: una etiquetada con el fluoróforo VIC y específica para 7028C, y la otra etiquetada con el fluoróforo FAM específicos para 7028T. El DNA se amplificó en un volumen final de 25 ul, con 12,5 ul de TaqMan Master Mix (Applied Biosystems), una concentración final de 0,9 mM de cada cebador, una concentración final de 0,2 mM de cada sonda, y de 10 ng del DNA total. Para comprobar que la PCR ha amplificado como para correr las digestiones con las enzimas de restricción se realizó electroforesis en gel de Agarosa. Por último se determinaron los RFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) tomando 5 µl del producto amplificado de la PCR y llevándolo a un volumen total de 10 o 12 µl que incluye el tampón de la correspondiente enzima, y 5 U de la misma.

	VIC	FAM	DIRECTO	REVERSO
H 7028	TAGTGGQQTGG GCTACAA (H)	TAGTGGAAGTGAGCTAC AA (NO H)	GCAAACCTCACTAGAC ATCGTACT	CCTATGATGGCAAATACAGC TCCTAT
U 1230 8	CCCCAAAATTTT G (NO U)	CCCAAGAAATTTTG (U)	GGTAACAGCTATCCATTG GTCTTAGG	GCATGGTTATTACTTTTATT GGAGTTGCA
JT 4216	AGCATTACTTATA TGAATGTCTC (NO JT)	CATTACTTATATGACATG TCTC (JT)	ACCTCCTATGAAAAA CTCTACCA	GGAATGCTGGAGATTGATA ATGGGTAT
J 1370 8	ACGCCTGCGCAGC CG (NO J)	ACGCCTGACAGCCG (J)	CCCCACCCTACTAAACCC CATTAA	TGTTAGTAATGAGAAATCCT GCGAATAGG

Tabla 3. Determinación haplogrupos mediante PCR.





RESULTADOS



5 - RESULTADOS:

Los datos han sido recogidos mediante el programa Microsoft Office Excel 2010[®] y han sido exportados a una matriz con formato propio del programa Statistical Package for the Social Sciences[®] (SPSS), para entorno Windows[®], en su versión 21.0

Se realizó un análisis descriptivo inicial que contiene los resultados estadísticos básicos para variables cuantitativas continuas y discretas de ambos grupos: media, desviación estándar, valor mínimo, valor máximo y rango, así como frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas nominales.

En el análisis univariante se ha tenido en cuenta la escala de medida de cada variable. Así, en las variables de tipo nominal u ordinal, se realizarán las correspondientes distribuciones de frecuencias, complementándose, en el análisis gráfico, con gráficos de barras o gráficos de sectores. En las variables medidas a nivel de intervalo y de razón, se calcularán diversas medidas de tendencia central y dispersión.

En los análisis bivariantes también se tendrá en cuenta la escala de medida de las variables implicadas. Si tanto la variable dependiente como la independiente son de tipo cualitativo, se emplearán tablas de contingencia, y en el análisis de la significación de la relación entre ambas se usará la prueba Chi-cuadrado; acompañando los resultados numéricos con gráficos de barras agrupadas. Cuando la variable dependiente sea cuantitativa y la independiente cualitativa se realizarán comparaciones de medias, añadiéndose la prueba de significación correspondiente y gráficos de barras de error a las tablas de comparación de medidas de tendencia central y dispersión. Previamente, se comprobará la normalidad de la variable dependiente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si la variable dependiente se ajusta a una distribución normal se realizará la prueba de la t de Student o el análisis de la varianza

(ANOVA), según la variable independiente tenga dos o más de dos categorías. Si la variable dependiente no es normal se realizarán las pruebas de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis (según la variable independiente tenga dos o más de dos categorías). En las comparaciones de medias en distintos momentos se van a emplear, según haya habido dos o más medidas, la prueba t de Student para muestras relacionadas, el ANOVA de medidas repetidas o bien las pruebas de Wilcoxon o de Friedman, realizándose las comparaciones múltiples en el caso de que haya diferencias estadísticas en las pruebas con más de dos medidas. El nivel de significación aceptado en todo el cálculo estadístico fue del 95% ($p < 0,05$).

IMPORTANCIA DEL TAMAÑO DEL EFECTO:

La Magnitud del Efecto (ME) es una manera de cuantificar la efectividad de una particular intervención relativa a alguna comparación. En la metodología cuantitativa aplicada a ciencias de la salud las limitaciones inherentes a la prueba de significación de la hipótesis nula (NHST, por sus siglas en inglés) han llevado a generar propuestas alternativas ante tal situación. Uno de dichos avances son las medidas de magnitud del efecto (effect size, ES). Concretamente, las ES cuantifican la presencia del fenómeno analizado. Así, por ejemplo, en el caso de la diferencia de medias entre grupos independientes usualmente evaluada con la t de Student, la d de Cohen (ES) cuantifica el tamaño de la diferencia (p. e., pequeña, mediana o grande). Asimismo, el coeficiente de correlación lineal (r) de Pearson, analizado como ES, indica la fuerza de la asociación. Por el contrario, con la NHST, ambos procedimientos informarían solo si la diferencia de medias o la correlación son estadísticamente diferentes de cero, pero sin cuantificar su magnitud. En consecuencia, su elección e interpretación varía según el diseño de investigación empleado.

En la actualidad, cada vez es más común el empleo de medidas del tamaño del efecto para informar los resultados de investigaciones en ciencias de la salud, debido a que brindan a la comunidad académica una interpretación más completa que la proporcionada por el test de significancia de la hipótesis nula que tiene una gran sensibilidad al tamaño muestral. Así, un estudio podría mostrar resultados estadísticamente significativos teniendo un tamaño del efecto grande y una muestra pequeña, o bien teniendo un tamaño del efecto pequeño y una muestra grande.

La existencia de diferencias según los grupos de comparación hace necesario también reportar los estadísticos del tamaño del efecto, como un procedimiento que permite cuantificar la magnitud de la diferencia entre grupos.



Análisis descriptivo

-Haplogrupos de mtDNA-

En la siguiente tabla se observa la muestra estudiada.

	<i>Total</i>	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>Otros</i>
<i>N ojos/ pacientes</i>	98/91	57/54	19/18	12/11	10/8

Tabla 4. Distribución del número de ojos y pacientes según haplogrupos de mtDNA.

-Sexo, edad y ojo afecto de la cohorte de pacientes-

La media de edad de los pacientes fue de $76,9 \pm 7,5$ años. La muestra cuenta con 33 (37%) hombres y 58 (63%) mujeres. La tabla 5 recoge el número de pacientes en función del género y ojo afectado.

<i>Ojo afecto</i>	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>
Izquierdo	17	22
Derecho	14	31
Ambos	2	5
Total pacientes	33	58

Tabla 5. Distribución de la afectación ocular según género.

-Diferencias de género entre halogrupos de mtDNA-

Al analizar la distribución del género de los pacientes de cada haplogrupo de mtDNA se obtienen los siguientes resultados:

Género	Haplogrupo (n)				
	HV	U	JT	Otros	Total
Masculino	23	7	3	2	35
Femenino	31	11	8	6	56

Tabla 6. Distribución de haplogrupos de mtDNA en función del género.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado se obtiene un valor del estadístico de 1,463 y una significación de 0,691, que lleva a afirmar que no hay diferencias significativas en el género de los pacientes entre los cuatro haplogrupos de mtDNA.

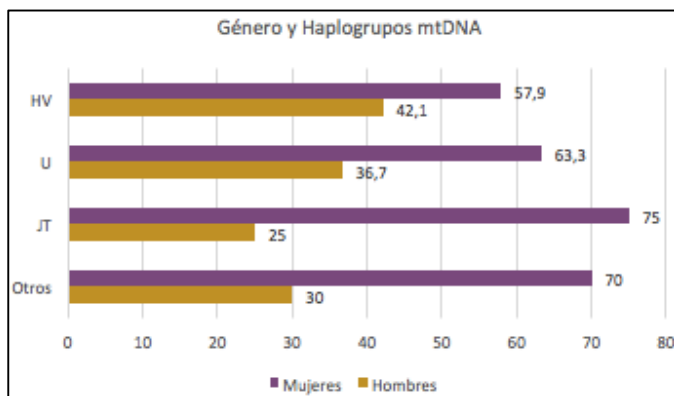


Gráfico 1. Distribución de hombres y mujeres según haplogrupos mtDNA (%).

-Diferencias de edad entre los haplogrupos mtDNA-

	<i>HV</i>	<i>JT</i>	<i>U</i>	<i>O</i>	<i>Total</i>
<i>Edad media (X±SD)</i>	77,3 (7,6)	78,3 (7,1)	75,9 (8,8)	75,2 (6,7)	76,9 (7,5)

Tabla 7. Edad media (años) de los pacientes en los diferentes haplogrupos de mtDNA.

Tras realizar la prueba de ANOVA de un factor, se obtuvo una significación en la comparación de la edad de los cuatro haplogrupos mtDNA de 0,560; lo que permite afirmar que no hay diferencia significativa en cuanto a la edad media de los pacientes de los cuatro haplogrupos de mtDNA.

-Factores de riesgo: HTA, Tabaco, Diabetes y Dislipemia-

Se analizaron cuatro factores de riesgo en los 91 pacientes afectados de DMAE neovascular, obteniéndose los siguientes resultados:

Factores de Riesgo	SI (n)	NO (n)
HTA	62	29
Tabaco	14	77
Diabetes	25	66
Dislipemia	39	52

Tabla 8. Distribución de los factores de riesgo en la muestra.

La tabla 9 hace referencia a los factores de riesgo y su distribución (%) respecto a los haplogrupos de mtDNA.

Factores de riesgo	Haplogrupo (%)			
	HV	U	JT	Otros
HTA	65,5%	66,7%	72,7%	62,5%
Tabaco	14,8%	16,6%	18,1%	12,5%
Diabetes	21,1%	16,7%	36,3%	37,5%
Dislipemia	35,1%	50,5%	54,4%	62,5%

Tabla 9. Distribución de factores de riesgo según los haplogrupos de mtDNA.

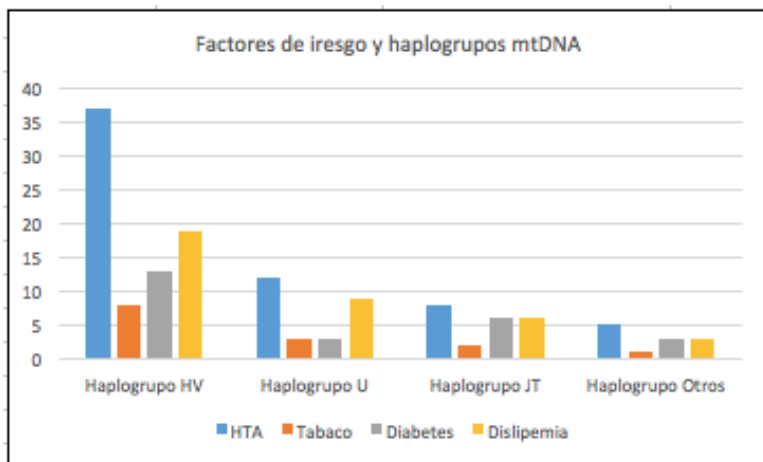


Gráfico 2. Distribución de factores de riesgo según haplogrupos de mtDNA (n).

Si se analiza la frecuencia de **Hipertensión arterial (HTA)** en cada haplogrupo de mtDNA se obtienen los resultados de la siguiente tabla:

Hipertensión arterial	Haplogrupo (n)				Total
	HV	U	JT	Otros	
Sí	35	12	8	5	62
No	19	6	3	3	29

Tabla 10. Relación de pacientes con o sin HTA en función del haplogrupo de mtDNA.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado se obtiene un valor del estadístico de 0,722 y una significación de 0,868; por lo que podemos concluir que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de hipertensión arterial entre los distintos haplogrupos de mtDNA.

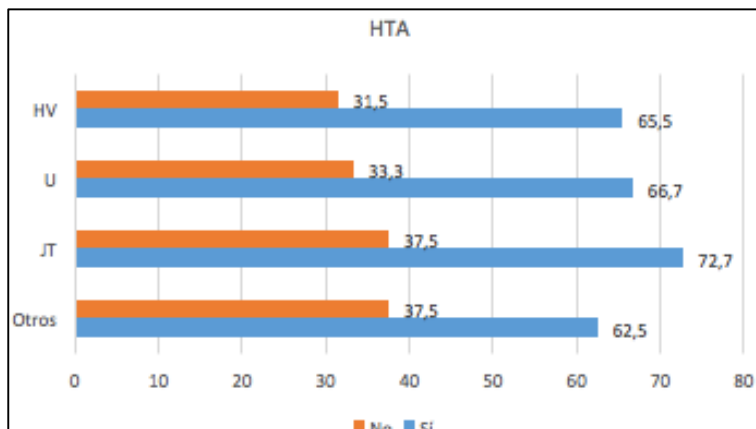


Gráfico 3. Distribución de HTA según haplogrupos de mtDNA (%).

Al analizar la frecuencia de **Consumo de tabaco** en cada haplogrupo de mtDNA, se obtienen los resultados de la siguiente tabla.

Tabaco	Haplogrupo (n)				Total
	HV	U	JT	Otros	
Sí	8	3	2	1	14
No	46	15	9	7	77

Tabla 11. Relación de pacientes con o sin tabaquismo en función del haplogrupo de mtDNA.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado se obtiene un valor del estadístico de 1,681 y una significación de 0,641; por lo que se concluye que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de consumo de tabaco entre los distintos haplogrupos.

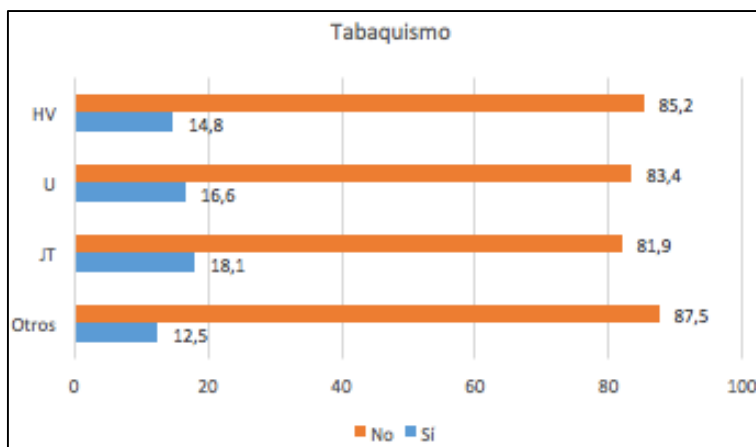


Gráfico 4. Distribución abaquismo según haplogrupos de mtDNA (%).

Al analizar la incidencia de **Diabetes mellitus** en cada haplogrupo de mtDNA, se obtienen los resultados de la siguiente tabla.

<i>Diabetes mellitus</i>	<i>Haplogrupo(n)</i>				<i>Total</i>
	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>Otros</i>	
Sí	11	3	4	3	25
No	43	15	7	5	66

Tabla 12. Relación de pacientes con o sin Diabetes en función del haplogrupo de mtDNA.

Al realizar la prueba Chi-cuadrado se obtiene un valor del estadístico de 4,524 y una significación de 0,210; por lo que se concluye que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de pacientes con diabetes mellitus en los cuatro haplogrupos.

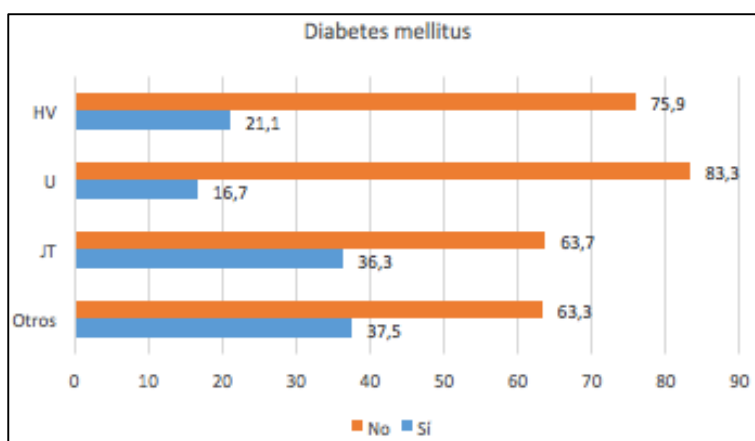


Gráfico 5. Distribución de Diabetes según haplogrupo de mtDNA (%).

Al estudiar la presencia de **Dislipemia** en cada haplogrupo de mtDNA, se obtienen los resultados de la siguiente tabla.

Dislipemia	Haplogrupo (n)				Total
	HV	U	JT	Otros	
Sí	19	9	6	5	39
No	35	9	5	3	52

Tabla 13. Relación de pacientes con o sin Dislipemia en función del haplogrupo de mtDNA.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado se obtiene un valor del estadístico de 1,651 y una significación de 0,648; por lo que se concluye que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de pacientes con dislipemia en los cuatro haplogrupos.

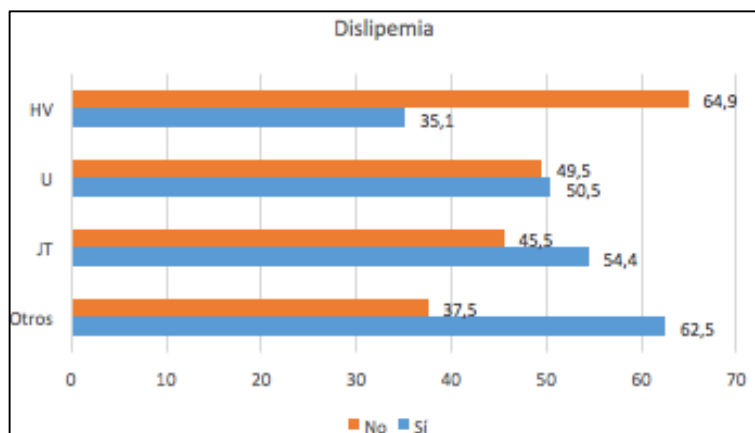


Gráfico 6. Distribución de Dislipemia según haplogrupos de mtDNA (%).

-Características basales de la enfermedad: tipo de membrana, afectación macular y foveal, agudeza visual, grosores centrales foveal y macular según haplogrupos de mtDNA-

-Diferencias de Agudeza Visual entre los haplogrupos de mtDNA-

	Haplogrupo				
	Total	HV	U	JT	Otros
Agudeza visual de media en letras ETDRS (SD)	46,1 (19,5)	44,8 (20,5)	47,6 (18,4)	40,8 (22,1)	57,0 (19,2)

Tabla 14. Agudeza visual media en número de letras de ETDRS según haplogrupos de mtDNA en estado basal.

Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis, el valor del estadístico es de 4,036, obteniendo una p de 0,387. Podemos concluir que las diferencias entre la AV basal media entre los distintos haplogrupos no son estadísticamente significativas.

-Diferencias de Grosor foveal central (GFC) entre los haplogrupos de mtDNA-

	Haplogrupo				
	Total	HV	U	JT	Otros
Grosor foveal medio (μm)	380,7 (99,10)	391,7 (94,0)	360,1 (82,3)	364,3 (81,9)	370,9 (82,3)

Tabla 15. Grosor foveal medio en μm según haplogrupos de mtDNA en estado basal.

Tras calcular la prueba de Kruskal-Wallis mostró un valor de 1,705 y una $p= 0,426$, pudiendo concluir así, que las diferencias de grosores foveales basales entre los haplogrupos de mtDNA, no son estadísticamente significativas.

-Diferencias de afectación foveal entre los halogrupos de mtDNA-

Al realizar el análisis de la afectación foveal medida por sd-OCT en cada haplogrupo de mtDNA, se obtienen los resultados que muestra la tabla.

Afectación foveal	Haplogrupo (n)				Total
	HV	U	JT	Otros	
Sí	51	16	11	7	85
No	6	3	1	3	13

Tabla 16. Análisis de la afectación foveal según haplogrupos de mtDNA.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado se obtiene un valor del estadístico de 3,383 y una significación de 0,336; por lo que se concluye que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de pacientes con afectación foveal en los cuatro haplogrupos de mtDNA.

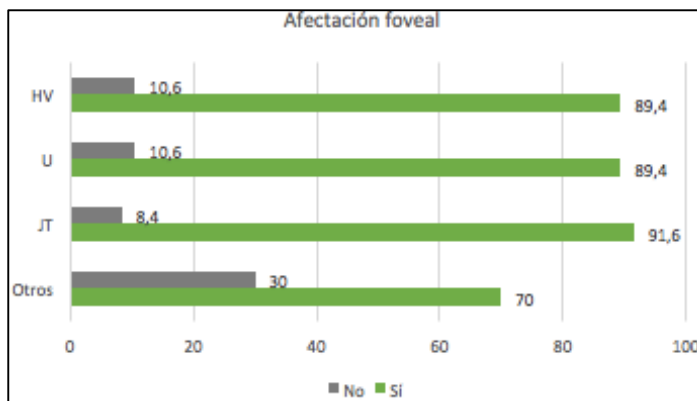


Gráfico 7. Afectación foveal según haplogrupos mtDNA (%).

-Diferencias de grosor macular (GM) entre halogrupos de mtDNA-

	<i>Haplogrupo</i>				
	<i>Total</i>	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>Otros</i>
Grosor macular medio (μm)	3.133 (613,23)	3.234 (495,6)	3.083 (426,5)	3.031 (385,7)	3.290 (280,1)

Tabla 17. Grosor macular medio en μm en estado basal según haplogrupos de mtDNA.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró un valor de 3,033 y una p de 0,387, pudiendo concluir que las diferencias de grosor macular basal entre los haplogrupos, no son estadísticamente significativas.

-Diferencias de afectación macular entre halogrupos de mtDNA.

Al realizar el análisis del **número de segmentos maculares afectados en OCT**, es decir, el área de afectación macular en cada haplogrupo de mtDNA se obtienen los resultados de la siguiente tabla.

<i>Número de áreas maculares afectadas</i>	<i>Haplogrupo</i>				<i>Estadístico (p)</i>
	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>Otros</i>	
Media	4,44	5,00	4,50	3,70	3,244 (0,355)
Desv. Típica	1,71	1,97	2,28	1,57	

Tabla 18. Análisis del número de áreas maculares afectas según haplogrupo de mtDNA.

Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis se obtiene un valor del estadístico de 3,244 y una significación de 0,355; por lo que se concluye que no hay diferencias significativas entre el número de áreas maculares afectadas de los pacientes de los cuatro haplogrupos de mtDNA.

-Tipo de membrana neovascular según haplogrupos de mtDNA-

Al realizar el análisis del **tipo de membrana neovascular** según sd-OCT en cada haplogrupo de mtDNA se obtienen los resultados de la siguiente tabla.

Tipo de membrana	Haplogrupo (n)				Total
	HV	U	JT	Otros	
Tipo 1	18	8	3	6	35
Tipo 2	15	0	2	0	17
Tipo 3	4	2	2	1	9
Mixta	20	9	5	3	37

Tabla 19. Análisis del tipo de membrana neovascular según el haplogrupo de mtDNA.

Al realizar la prueba de Chi-cuadrado se obtiene un valor del estadístico de 12,498 y una significación de 0,187¹; por lo que se concluye que no hay diferencias significativas en el tipo de membrana neovascular entre los distintos haplogrupos de mtDNA.

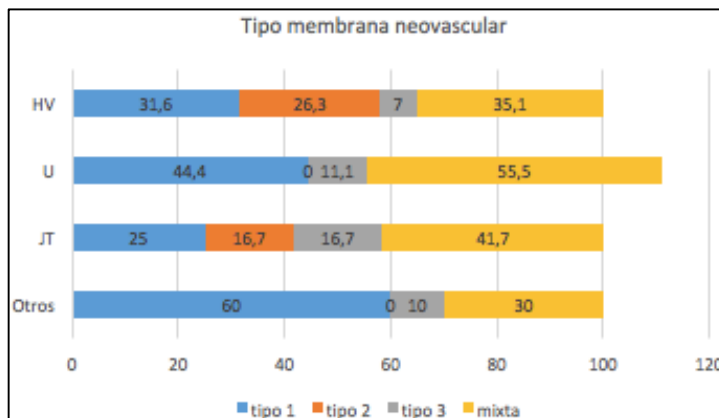


Gráfico 8. Distribución del tipo de membrana neovascular según haplogrupos (%).

¹ Debido al gran tamaño de la tabla (4x4) respecto al tamaño de la muestra, no se cumplen los requisitos de la prueba Chi-cuadrado; por lo que las afirmaciones que se deriven de la prueba han de ser consideradas como un indicio de lo que realmente se obtendría en el caso de disponer de suficientes casos en la muestra.

Análisis estadístico

A continuación se expondrá en análisis estadístico realizado con los datos obtenidos de nuestra población a estudio.

-Diferencias del número de inyecciones entre los halogrupos de mtDNA-

La tabla 20 muestra la media de inyecciones administrada en un año de seguimiento en cada uno de los haplogrupos mtDNA, teniendo en cuenta la dosis de carga.

	<i>Total</i>	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>O</i>
<i>Nº medio de inyecciones de ranibizumab.</i>	6,7 (1,7)	6,9 (1,9)	6,4 (1,8)	7,1 (1,5)	6,5 (1,5)

Tabla 20. Número de inyecciones de media según haplogrupos de mtDNA tras 52 semanas

Tras realizar la prueba de Kruskal-Wallis obtuvimos un valor de p de 0,367, concluyendo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el número anual de inyecciones recibidas en cada haplogrupo mtDNA. Podemos afirmar, pues, que los distintos haplogrupos recibieron de media un número de inyecciones similar durante las 52 semanas de tratamiento.

Población a las 52 semanas de tratamiento:

Se hizo un estudio descriptivo de los pacientes a la 52 semanas de tratamiento, contando la pérdida de 18 pacientes que se excluyeron por no cumplir criterios. Analizamos las variables basales para comprobar la homogeneidad de nuevo de los grupos.

	<i>Total</i>	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>O</i>
<i>N (ojos)/ pacientes</i>	76/73	45/45	13/12	10/9	8/7

Tabla 21. Número de ojos/pacientes según haplogrupos de mtDNA a las 52 semanas.

-Diferencias de género entre los haplogrupos de mtDNA.

<i>Sexo</i>	<i>Haplogrupos (n)</i>				<i>Total</i>
	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>Otros</i>	
<i>Varón</i>	15	4	4	2	25
<i>Mujer</i>	30	5	8	5	48

Tabla 22 .Distribución del género en función del haplogrupo de mtDNA a las 52 semanas.

Al realizar la prueba Chi-cuadrado se obtuvo un valor de p de 0,691, lo cual permite afirmar que no hay diferencias significativas de género en de los pacientes de los cuatro haplogrupos de mt DNA.

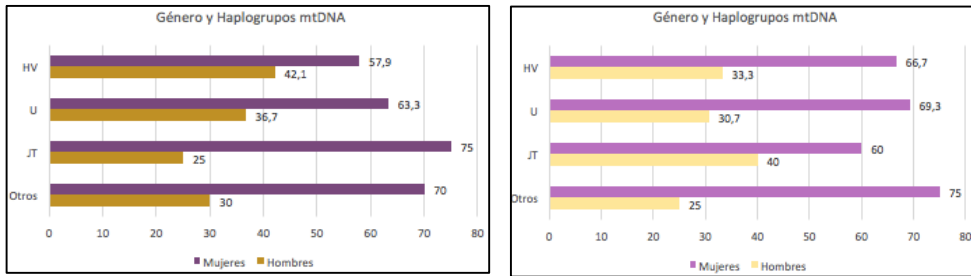


Gráfico 9. Distribución comparativa del género en pacientes en estado basal y a las 52 semanas (%).

-Diferencias de edad entre los diferentes haplogrupos de mtDNA-

	Total	HV	U	JT	O
Edad media	76,9 (7,5)	76,1 (7,0)	74,8 (8,3)	79,8 (8,4)	72,7 (4,0)

Tabla 23. Distribución de la media de edad según haplogrupos de mtDNA a las 52 semanas.

Realizado el Anova de un factor se obtiene un valor del estadístico de 1,173 y una significación de 0,329, lo que lleva a afirmar que no hay diferencias significativas en la media de edad de los pacientes en los diferentes haplogrupos de mtDNA en la medición realizada a las 52 semanas.

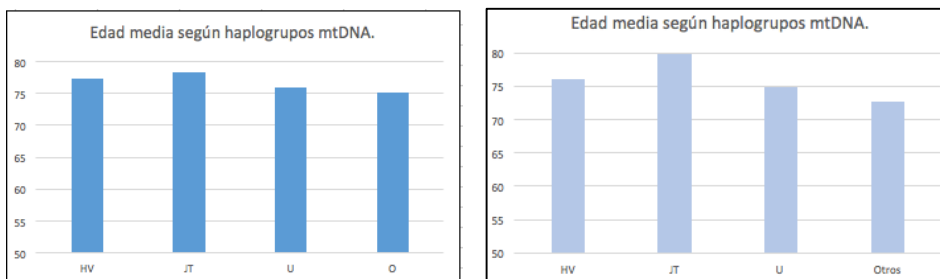


Gráfico 10. Distribución comparativa de la edad según haplogrupos mtDNA en estado basal y a las 52 semanas (%).

-Diferencias del tipo de membrana neovascular entre los diferentes halogrupos de mtDNA.

Tipo de membrana	Haplogrupo (n)				Total
	HV	U	JT	Otros	
Tipo 1	14	5	3	4	27
Tipo 2	10	1	2	1	12
Tipo 3	4	2	1	1	8
Mixta	17	5	4	2	29

Tabla 24. Tipo de membrana neovascular según haplogrupos mtDNA a las 52 semanas.

Al realizar la prueba Chi-cuadrado en la medición de la semana 52, se obtiene un valor del estadístico de 2,951 y una significación de 0,966; por lo que se concluye que no hay diferencias significativas en el tipo de membrana neovascular entre los distintos haplogrupos de mtDNA a las 52 semanas.

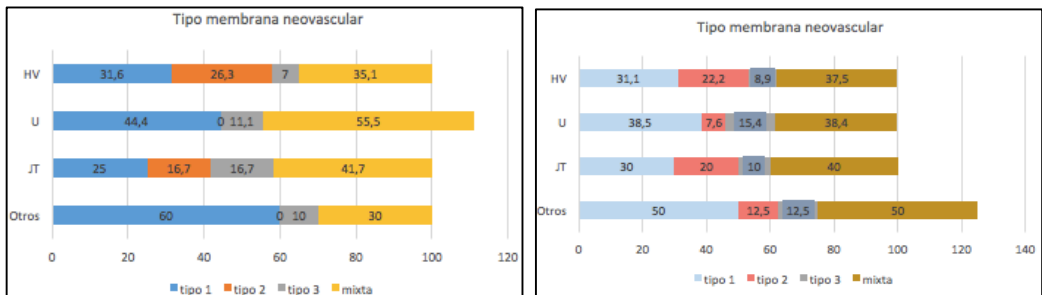


Gráfico 11. Distribución del tipo de membranas neovascular según haplogrupos mtDNA en estado basal y a las 52 semanas (%).

-Evolución Agudeza visual (AV)-

<i>Agudeza Visual</i>	<i>Num. Letras ETDRS Media (D.Tip.)</i>
AV basal	46,1 (19,5)
AV 16ª semana	55,1 (17,7)
AV 52ª semana	53,9 (17,6)

Tabla 25. Agudeza Visual (AV) media medida en número de letras en estado basal, a las 16 semanas.

Al realizar una ANOVA de medidas repetidas para comprobar si ha habido un cambio significativo en la evolución de la AV se obtuvo un valor de la significación del estadístico menor de 0,01. Por ello, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye con que, al menos, hay una medición con una media significativamente diferente al resto. Para comprobar cual o cuales de las medias son diferentes, se procede a realizar las Comparaciones múltiples de Bonferroni, obteniéndose que es la medida basal la que es significativamente mayor que las otras dos, no habiendo diferencia significativa entre estas dos últimas.

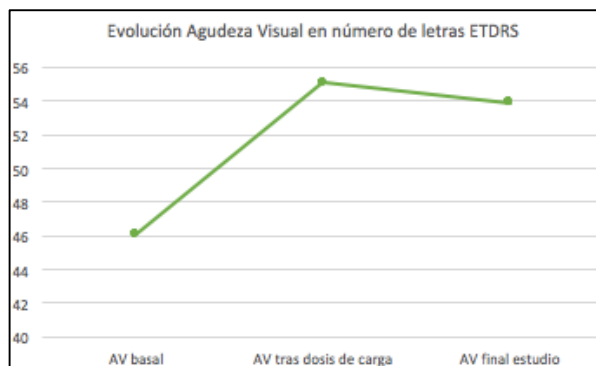


Gráfico 12. Análisis de la evolución de la AV media en estado basal, tras la dosis de carga (a las 16 semanas) y tras 52 semanas.

Al comparar la AV basal con la AV tras la dosis de carga se obtuvo un valor de $p=0,013$ concluyéndose que esta mejoría fue estadísticamente significativa. Al comparar los valores entre la dosis de carga y las 52 semanas, se obtuvo un valor de $p=0,147$, pudiendo concluir que los cambios de visión producidos durante este periodo no fueron estadísticamente significativos. Al comparar la AV basal con la AV a las 52 semanas, encontráramos un valor de $p=0,049$, concluyendo que la mejoría experimentada de media tras un año de tratamiento fue estadísticamente significativa.

-Tras la dosis de carga:

Un 38,8% ganaron tres o más líneas ETDRS (≥ 15 letras).

Un 13,2 % ganaron entre ≥ 1 a 2 líneas ETDRS (entre 6-14 letras).

Un 29,6 % ganaron entre 0 y 1 línea ETDRS (0-5 letras)

Un 18,4% perdieron letras en ETDRS.

-Comparando la AV entre basal y la 52ª semana, tras las 6,7 (1,7) inyecciones de Lucentis®:

Un 28,9% ganaron tres o más líneas ETDRS (≥ 15 letras).

Un 11,8 % ganaron entre ≥ 1 a 2 líneas ETDRS (entre 6-14 letras).

Un 13,1 % ganaron entre 0 y 1 línea ETDRS (0- 5 letras)

Un 19,7 % perdieron entre 1 y 5 letras en ETDRS.

Un 26,5 % perdieron más de 5 letras en ETDRS:

Siendo 15,7% los que perdieron entre 6-14 letras en ETDRS

Siendo 10,8 % los que perdieron ≥ 15 letras en ETDRS.

-Hallazgos en tomografía de coherencia óptica (SD-OCT).

Grosor foveal central (GFC):

<i>Grosor foveal (GF)</i>	<i>Media en μm (D.Tip.)</i>
GF basal	380,6 (99,10)
GF 16ª semana	251,1 (69,74)
GF 52ª semana	281,5 (98,00)

Tabla 26. Grosor foveal (GF) medio en μm en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas.

Al realizar una ANOVA de medidas repetidas para comprobar si ha habido un cambio significativo en la evolución del GFC, se obtiene un valor de la significación del estadístico menor que 0,001. Por ello, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye con que, al menos, hay una medición con una media significativamente diferente al resto. Para comprobar cual o cuales de las medias son diferentes, se procede a realizar las Comparaciones múltiples de Bonferroni, obteniéndose que es la medida basal la que es significativamente mayor que las otras dos, no habiendo diferencia significativa entre estas dos últimas.

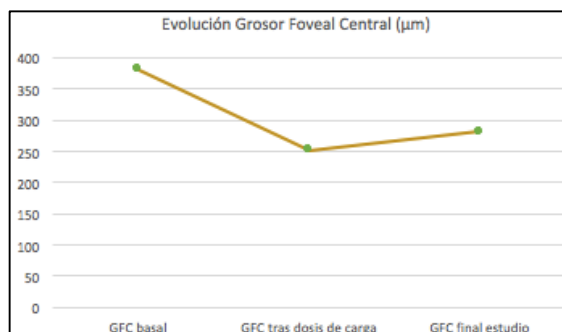


Gráfico 13. Análisis de la evolución del grosor foveal media en estado basal), tras la dosis de carga a las 16 semanas y tras 52 semanas.

Se aprecia una clara mejoría tras la dosis de carga, pues partiendo de valores iniciales de 380,7 (99,1) μm se pasa a 251,1 (69,7) μm tras la dosis de carga (16ª semana). Esta disminución de 129,5 μm (34% del grosor foveal central) fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

El GFC a las 52 semanas fue de 281,5 (98,0) encontrando una $p = 0,104$ tras compararlo con el de las 16 semanas. De media, los pacientes han visto incrementado el GFC en 30,4 μm (12%) entre la dosis de carga (16ª semana) y la semana 52, cuyo valor de p indica que este aumento del GFC no fue estadísticamente significativo. Por lo que podremos concluir que el GFC se mantiene estable en el primer año con una media de 6,7 (1,7) inyecciones en las 52 semanas.

Al comparar el GFC basal con el GFC a las 52 semanas, encontramos que hubo una disminución del grosor de 99,1 μm (26%) con una p de $< 0,001$. Por lo que podremos concluir que, tras un año de tratamiento, los pacientes mejoraron el GFC en un 26% respecto al basal, considerándose esta mejoría estadísticamente significativa.

-Tras la dosis de carga:

Un 39% disminuyeron el GFC al menos un 34%.

Un 56% disminuyeron el GFC entre un 5-34%.

Un 5% disminuyeron el GFC igual o menos del 5 %.

-Comparando el GFC entre la medición basal y la de la 52ª semana, tras las 6,7 (1,7) inyecciones de Lucentis®:

Un 16% de los pacientes incrementaron el GFC entre 0 y 100 μm (0-34%)

Un 40% de los pacientes disminuyeron el GFC entre 0 y 129 μm (0-34%)

Un 44% de los pacientes disminuyeron el GFC más de 129 μm (34%).

Grosor macular (GM):

<i>Grosor Macular (GM)</i>	<i>Media um (D.Tip.)</i>
GM basal	3.133 (613,23)
GM 16 semana	2.221 (392,74)
GM 52 semana	2.316 (598,45)

Tabla 27. Grosor macular (GM) medio en μm en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas de seguimiento.

Al realizar una ANOVA de medidas repetidas para comprobar si ha habido un cambio significativo en la evolución del grosor macular se obtuvo un valor de la significación del estadístico menor de 0,001. Por ello, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que hay, al menos, hay una medición con una media significativamente diferente al resto. Para comprobar cual o cuales de las medias son diferentes se procede a realizar las Comparaciones múltiples de Bonferroni, obteniéndose que es la medida basal la que es significativamente mayor que las otras dos, no habiendo diferencias significativas entre estas dos últimas.

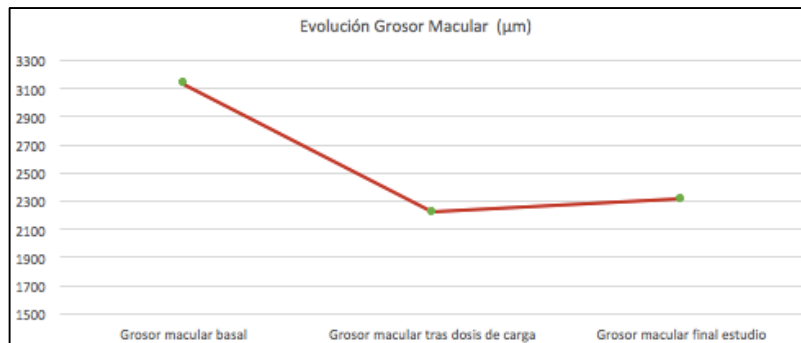


Gráfico 14. Análisis de la evolución del grosor macular medio en estado basal, tras la dosis de carga a las 16 semanas y tras 52 semanas.

Se aprecia una clara mejoría, pues partiendo de valores iniciales de 3133 (613) μm , tras la dosis de carga (16ª semana), se reduce a 2221 (392) μm . Esta disminución de 912 μm (29,5%) del grosor macular central tras la dosis de carga fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$). El grosor macular a las 52 semanas fue de 2316 (598) μm , encontrando una $p = 0,222$ al compararlo con las cifras a las 16 semanas. De media, los pacientes han visto incrementado el grosor macular en 95 μm (4,2%) entre la dosis de carga (16ª semana) y la de la semana 52, cuyo valor de p indica que este aumento del grosor macular no es estadísticamente significativo. Por ello, se puede concluir que el grosor macular se mantiene estable en el primer año con una media de 6,7 (1,7) inyecciones a las 52 semanas. Así, tras la dosis de carga, los pacientes recibieron de media 3,7 inyecciones en 8 meses.

Al comparar el grosor macular basal con el grosor macular a las 52 semanas, encontramos que hubo una disminución del grosor de 816 μm , siendo la $p < 0,001$ por lo que podremos concluir que tras un año de tratamiento los pacientes mejoraron un 26% su grosor macular respecto al basal, considerando esta mejoría estadísticamente significativa.

-Tras la dosis de carga:

Un 56 % disminuyeron el grosor macular al menos un 29,5 %.

Un 38,5% disminuyeron el grosor macular entre 5-29%.

Un 5,5% disminuyeron el grosor macular igual o menos del 5 %.

-Comparando el Grosor macular entre la basal y en la 52ª semana, tras las 6,7 (1,7) inyecciones de Lucentis®

Un 85 % de los pacientes mejoraron, disminuyendo el grosor macular.

Un 15% de los pacientes empeoraron, incrementando el grosor macular entre 0-29%.

Grosor por segmentos:

Segmento macular	Grosor medio en μm Basal (SD)	Grosor medio en μm 16 sem (SD)	Grosor medio en μm 52 sem (SD)	Estadístico (p)
TIM	356 (70,9)	247 (60,8)	263 (70,7)	36,9 (<0,001)**
SIM	371 (73,3)	266 (64,5)	277 (82,2)	27,2 (<0,001)**
NIM	383 (90,7)	262 (60,2)	300 (79,7)	37,1 (<0,001)**
IIM	381 (82,3)	259 (50,1)	277 (66,4)	44,7 (<0,001)**
TEM	306 (63,4)	213 (53,8)	219 (45,5)	43,7 (<0,001)**
SEM	316 (64,5)	231 (55,3)	233 (54,4)	29,5 (<0,001)**
NEM	338 (67,8)	250 (50,0)	264 (59,4)	43,809 (<0,001)**
IEM	331 (76,1)	237 (47,8)	245 (52,8)	42,408 (<0,001)**

* Significativo al 95%. ** Significativo al 99%.

Tabla 28. Grosor macular medio en μm en cada segmento de OCT en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas. TIM: Segmento Macular Interno Temporal; SIM: Segmento Macular Interno Superior; NIM: Segmento Macular Interno Nasal; IIM: Segmento Macular Interno Inferior; TEM: Segmento Macular Externo Temporal; SEM: Segmento Macular Externo Superior; NEM: Segmento Macular Externo Nasal; IEM: Segmento Macular Externo Inferior.

Tras realizar ANOVA de medidas repetidas (con empleo de comparaciones múltiples de Bonferroni) se observa que en todos los segmentos hay un cambio significativo en, al menos, una de las medidas realizadas. Se ha destacado con letra negrita aquella media que ha resultado estadísticamente diferente a las otras dos en el posterior análisis de comparaciones múltiples. En la mayoría de los segmentos es la medida basal la que resulta significativamente diferente a las otras dos; sólo en “NIM” se observan diferencias significativas de todas las medias entre sí.

Esto significa que, tras la dosis de carga, todos los segmentos mejoraron, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los grosores basales (pre-tratamiento) y los grosores a las 16 semanas (post-dosis de carga). Sin embargo, cuando se compararon los grosores post-dosis de carga (a las 16 semanas) con los grosores finales (52 semanas) se obtuvo una p no significativa. Esto quiere decir, que la disminución del grosor se mantuvo

estable, o con cambios no significativos hasta la semana 52 con el tratamiento pautado.

Si comparamos los grosores basales con los obtenidos en la semana 52, se encontró una diferencia estadísticamente significativa, pudiendo concluir que los pacientes tras un año de tratamiento estaban significativamente mejor.

Sólo en el segmento nasal interno, observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grosor tras la dosis de carga y el apreciado a las 52 semanas. Esto significa que el grosor del segmento nasal interno fue empeorando progresivamente, hasta que en la semana 52 las diferencias con respecto a la semana 16 se consideraron estadísticamente significativas. Se puede concluir que éste es el único segmento que no se mantuvo estable con el tratamiento y que empeoró significativamente.

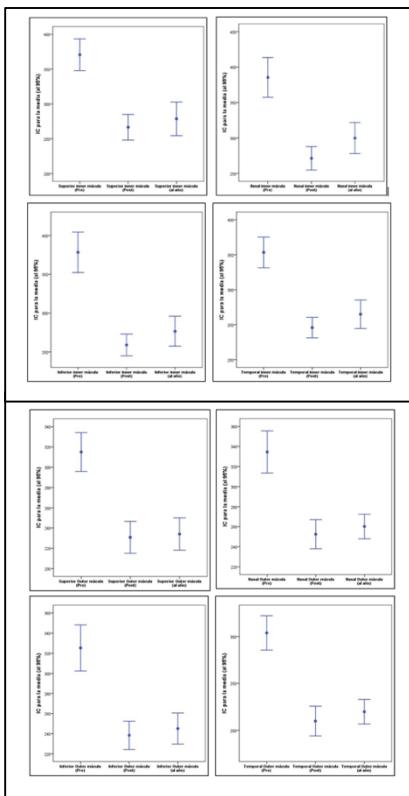


Gráfico 15. Análisis de la evolución del grosor medio según segmentos internos (Superior, Nasal, Inferior y Temporal) maculares de OCT en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas.

Gráfico 16. Análisis de la evolución del grosor medio según segmentos externos (Superior, Nasal, Inferior y Temporal) maculares de OCT en estado basal, a las 16 y 52 semanas.

-Análisis de la evolución de la AV según haplogrupos mtDNA-

La distribución de la AV según (n) ojos y haplogrupos mtDNA se resume en la siguiente tabla:

	<i>Haplogrupo</i>			
	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>Otros</i>
AV media basal en letras ETDRS (sd)	44,8 (20,5)	47,6 (18,4)	40,8 (22,1)	57,0 (19,2)
AV media 16ª semana en letras ETDRS (sd)	50,9 (21,7)	57,1 (17,3)	56,3 (22,4)	60,0 (17,8)
Núm. letras ganadas entre basal y 16 semanas.	6,1	9,5	15,5	3
AV media ETDRS 52ª semana en letras (sd)	53,1 (18,7)	60,9 (17,1)	40,0 (9,5)	57,9 (12,9)
Num. letras ganadas entre las 16 semanas y las 52 semanas	2,2	3,8	-16,3	-2,1
Num. letras ganadas entre la basal y las 52 semanas.	8,3	13,3	-0,8	0,9

Tabla 29. Resumen de la evolución de la AV en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas haplogrupos de mtDNA.

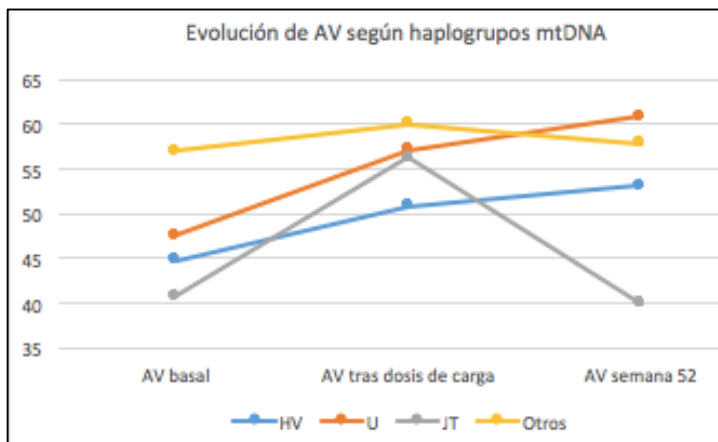


Gráfico 17. Evolución de AV media según haplogrupos mtDNA.

COMPARACIÓN DE AV BASAL CON AV TRAS LA DOSIS DE CARGA (16 SEMANAS).

Al comparar la AV de los diferentes haplogrupos mtDNA entre sí a las 16 semanas (tras la dosis de carga) mediante la realización del estadístico de Kruskal-Wallis obtuvimos un valor de 2,445 con una p de 0,485. Por ello, se puede concluir que la AV entre los haplogrupos mtDNA a las 16 semanas, no mostró diferencias estadísticamente significativas. También se comparó si la ganancia en letras entre los distintos haplogrupos fueron estadísticamente significativas, hallándose un valor de p de 0,183 y concluyendo, por tanto, que no lo fueron.

Al comparar la AV basal con aquella tras la dosis de carga según los haplogrupos de mtDNA, obtuvimos unos valores de p que se pueden observar en la tabla 30. Vemos como la mejoría experimentada por los haplogrupos HV, U y JT sí fue estadísticamente significativa, caso contrario al grupo Otros.

Comparación AV	Valor de p			
	HV	U	JT	Otros
Basal – 16 semanas	0,021	0,002	0,002	0,593

Tabla 30. Comparación de AV entre basal y 16 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor estadístico (p).

COMPARACIÓN DE AV ENTRE LA SEMANA 16 Y LA SEMANA 52.

En la tabla 31 se pueden observar los valores de p al comparar el cambio de visión experimentado entre la semana 16 y la 52 para cada haplogrupo. Vemos como el haplogrupo JT empeoró significativamente.

Valor de p				
Comparación AV	HV	U	JT	Otros
16 semanas – 52 semanas	0,238	0,44	0,023	1,00

Tabla 31. Comparación de AV entre 16 y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor estadístico (p).

COMPARACIÓN DE AV ENTRE LA BASAL Y LA SEMANA 52.

Al calcular el estadístico Kruskal-Wallis 7,160 que compara la AV entre los haplogrupos en la semana 52, encontramos una p de 0,0501, afirmando que la AV encontrada entre los distintos haplogrupos de mtDNA no fue estadísticamente significativa entre ellos. Sin embargo, vemos como el valor del estadístico está muy cerca de la significación estadística, pues se puede comprobar como la diferencia entre el haplogrupo U y JT fue claramente diferente. Si vemos la tabla del tamaño del efecto, podemos observar como la comparación a las 52 semanas entre el U y el JT es de 0,42.

Sin embargo, como vemos en la tabla 32, al comparar la AV entre basal y a las 52 semanas de tratamiento, vemos como el haplogrupo HV y U mantuvieron una visión significativamente mejor que la basal.

Valor de p				
Comparación AV	HV	U	JT	Otros
Basal – 52 semanas	0,024	0,0385	1,000	0,718

Tabla 32. Comparación de AV entre basal y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).

TABLA CON LOS TAMAÑOS DE EFECTO POR PARES DE HAPLOGRUPOS

La interpretación de este “r” es la siguiente:

Valores en torno a 0,10 = Tamaño del efecto PEQUEÑO

Valores en torno a 0,30 = Tamaño del efecto MEDIO

Valores en torno a 0,50 = Tamaño del efecto GRANDE

	Comparaciones por pares de grupos en cada momento					
	HV-U	HV-JT	HV-Otros	U-JT	U-Otros	JT-Otros
AV en letras (basal)	0,06	0,07	0,21	0,16	0,25	0,38
AV en letras (16 semanas)	0,11	0,10	0,16	0,01	0,14	0,05
AV en letras (52 semanas)	0,15	0,22	0,08	0,42	0,14	0,50
	Comparaciones por pares de medidas en cada grupo					
	Pre – Post		Pre – Año		Post – Año	
Grupo HV	0,22		0,14		0,17	
Grupo U	0,47		0,25		0,03	
Grupo JT	0,49		0,02		0,33	
Grupo Otros	0,12		0,27		0,06	

Tabla 33. Valor del tamaño del efecto de AV en las comparaciones por pares de medidas por grupo y tiempo.

-Análisis de la evolución del grosor foveal central (GFC) según haplogrupos mtDNA-

	<i>Haplogrupo</i>			
	<i>HV</i>	<i>U</i>	<i>JT</i>	<i>Otros</i>
GFC medio basal en μm (sd)	391 (94,0)	360 (82,3)	364 (81,9)	370,(82,3)
GFC medio 16 semanas en μm (sd)	255 (72,2)	250 (84,2)	224 (33,3)	223 (48,0)
*Diferencia de GFC entre basal y 16 sem (um).	Reducción 136,6	Reducción 109,7	Reducción 139,4	Reducción 147,1
Diferencia del GFC (%)	32,3	28,8	37,0	37,9
GFC medio en 52 semana en μm (sd)	285 (91,6)	216 (77,3)	368 (123,4)	284 (43,1)
*Diferencia entre GFC 16 sem y a las 52 semanas (um).	Incremento 29,6	Reducción 34,2	Incremento 143,1	Incremento 60,9
Diferencia del GFC (%)	10,3	13,6	38,8	21,4
*Diferencia entre el GF C basal y las 52 semanas (um).	Reducción 106,1	Reducción 143,8	Incremento 3,7	Reducción 86,2
Diferencia del GFC (%)	27,2	40	1,1	23,2

Tabla 34. Resumen de la evolución del Grosor foveal en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas según haplogrupos de mtDNA.

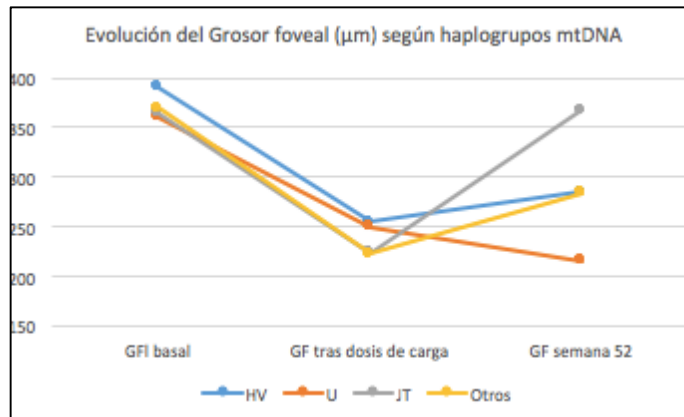


Gráfico 18. Evolución grosor foveal medio según haplogrupos mtDNA.

COMPARACIÓN ENTRE EL GFC BASAL Y TRAS LA DOSIS DE CARGA

(16 semanas).

Al realizar el estadístico de Kruskal-Wallis, hallamos un valor de 1,510, encontrando una $p= 0,680$, concluyendo que los haplogrupos de mtDNA mostraron un GFC tras la dosis de carga similar, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Si comparamos las reducciones del GFC entre los diversos haplogrupos, vemos como la p es 0,713, por lo que podemos concluir que estas disminuciones de grosores entre haplogrupos tampoco fueron significativos.

Sin embargo, se apreció una reducción del GFC en todos los grupos de haplogrupos de mtDNA, constatando que estas diferencias sí fueron estadísticamente significativas. En la tabla 35 pueden observarse los valores de p que confirman dichos resultados.

Concluyendo entonces, que todos los haplogrupos de mtDNA mejoraron de forma significativa en su GFC tras recibir la dosis de carga.

Valor de p				
Comparación CFC	HV	U	JT	Otros
Basal-16 semanas	<0,001	0,043	0,028	0,007

Tabla 35. Comparación del GFC basal y a las 16 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor estadístico (p).

COMPARACIÓN ENTRE EL GFC TRAS LA DOSIS DE CARGA Y LAS 52 SEMANAS.

En la tabla 36 vemos los valores de p nos indican que los cambios que se produjeron en los valores de GFC de media según haplogrupos durante el periodo de tratamiento entre la semana 16 y la 52 no fueron estadísticamente significativos, o sea, se mantuvieron estables durante el seguimiento.

Valor de p				
Comparación CF	HV	U	JT	Otros
16 sem - 52 sem	0,472	1,000	0,250	0,245

Tabla 36. Comparación de Grosor foveal entre 16 y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).

COMPARACIÓN DE GFC ENTRE EL ESTADO BASAL Y LAS 52 SEMANAS:

Al calcular el estadístico de Krustal-Walis, la diferencia entre los GFC de los diferentes grupos de haplogrupos eran significativamente diferentes entre ellos a las 52 semanas. Se encontró un valor de 13,08 con una p de 0,004. Esto nos permitió concluir que había diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de haplogrupos mtDNA. Realizadas las correspondientes pruebas, sólo se han obtenido diferencias significativas entre los diferentes haplogrupos en la medida del GFC tras un año: el haplogrupo U resultó ser significativamente

menor que la media de JT. Encontrando una significación de la comparación JT-U de 0,010.

En la tabla 37 se pueden observar los valores de p de la mejoría obtenida tras un año de tratamiento según haplogrupos mtDNA. Vemos como HV y U mejoraron significativamente. Sin embargo, JT y otros no obtuvieron esa mejoría. Destacar el caso del haplogrupo JT cuyos valores a las 52 semanas eran muy similares a los basales.

Valor de p				
Comparación CF	HV	U	JT	Otros
Basal-52 semanas	<0,001	0,007	1,000	0,582

Tabla 37. Comparación de Grosor foveal basal y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).

TABLA CON LOS TAMAÑOS DE EFECTO POR HAPLOGRUPOS

La interpretación de este coeficiente “r” es la siguiente:

Valores en torno a 0,10 = Tamaño del efecto PEQUEÑO

Valores en torno a 0,30 = Tamaño del efecto MEDIO

Valores en torno a 0,50 = Tamaño del efecto GRANDE

	Comparaciones por pares de grupos en cada momento					
	HV-U	HV-JT	HV-Otros	U-JT	U-Otros	JT-Otros
GFC basal	0,13	0,08	0,09	0,01	0,06	0,01
GFC 16 semanas	0,07	0,12	0,10	0,02	0,06	0,03
GFC 52 semanas	0,28	0,19	0,08	0,46	0,43	0,30
	Comparaciones por pares de medidas en cada grupo					
	Pre – Post		Pre – Año		Post – Año	
Grupo HV	0,51		0,36		0,16	
Grupo U	0,40		0,48		0,22	
Grupo JT	0,51		0,24		0,41	
Grupo Otros	0,56		0,45		0,45	

Tabla 38. Valor del tamaño del efecto del Grosor Foveal en las comparaciones por pares de medidas por grupo y tiempo.

-Análisis de la evolución del grosor macular (GM) según haplogrupos mtDNA-

	Haplogrupo			
	HV	U	JT	Otros
GM medio en um basal (sd)	3.234 (495)	3.083 (426)	3.031 (385)	3.290 (280)
GM medio 16 semanas en um (sd)	2.267 (449)	2.152 (387)	2.123 (251)	2.234 (147)
*Diferencia de GM entre pre y 16 sem (um).	Reducción 967,5	Reducción 930,7	Reducción 909,8	Reducción 1056,9
Diferencia del GM (%)	28,7 (12,1)	30,2 (15,2)	30,2 (5,0)	30,5 (9,1)
GM medio 52 semanas en um (sd)	2.367 (487)	2.035 (387)	2.949 (684)	2.408 (141)
*Diferencia de GM entre 16 y 52 sem (um).	Incremento 99,9	Reducción 117	Incremento 825,9	Incremento 174,4
Diferencia del GM (%)	4,2	5,4	28,0	7,2
*Reducción de GM entre basal y 52 sem (um).	Reducción 867,6	Reducción 1047,7	Reducción 81,9	Reducción 882,5
Diferencia del GM (%)	26,8	33,9	2,7	26,8

Tabla 39. Resumen de la evolución del grosor foveal en estado basal, a las 16 semanas y a las 52 semanas según haplogrupos de mtDNA.

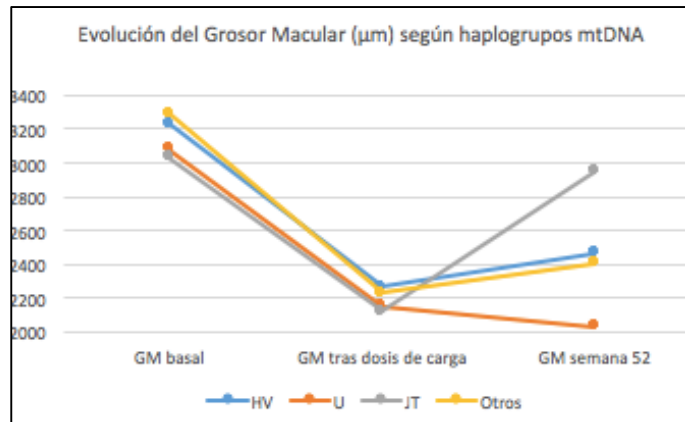


Gráfico 19. Evolución grosor macular medio según haplogrupos mtDNA.

COMPARACIÓN DE GM ENTRE EL ESTADO BASAL Y TRAS LA DOSIS DE CARGA (16 semanas).

Al realizar el estadístico de Kruskal-Wallis, hallamos un valor de 3,033 encontrando una $p=0,387$, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los GM de cada haplogrupo de mtDNA a las 16 semanas.

Sin embargo, podemos observar en la tabla 40 los valores de p al comparar los GM entre el basal y las 16 semanas según haplogrupos mtDNA. Vemos como todos los haplogrupos mtDNA obtuvieron mejorías significativas en sus GM tras la dosis de carga.

Valor de p				
Comparación GM	HV	U	JT	Otros
Basal-16 semanas	<0,001	0,002	0,009	0,001

Tabla 40. Comparación de Grosor macular entre basal y 16 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).

COMPARACIÓN DE GM ENTRE LAS 16 Y 52 SEMANAS.

En la tabla 41 observamos los valores de p según haplogrupos mtDNA durante el periodo tras la dosis de carga y las 52 semanas. Vemos como las diferencias en los GM no fueron significativas para los haplogrupos HV, U ni Otros; sin embargo, vemos como el haplogrupo JT si tuvo diferencias significativas. En este caso, el haplogrupo JT experimentó un aumento considerable del grosor macular durante este periodo que sí fue estadísticamente significativo.

Valor de p				
Comparación GM	HV	U	JT	Otros
16 semanas-52semanas	0,258	0,540	0,009	0,248

Tabla 41. Comparación de grosor macular entre 16 y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).

COMPARACIÓN DE GM ENTRE EL ESTADO BASAL Y LAS 52 SEMANAS

Al calcular el estadístico de Kruskal-Wallis, la diferencia entre los grosores maculares de los diferentes grupos de haplogrupos eran significativamente diferentes a las 52 semanas. Se encontró un valor de 13,440 con una p de 0,004. Esto nos permitió concluir que había diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de haplogrupos a las 52 semanas. Realizadas las correspondientes pruebas de comparaciones múltiples, sólo se han obtenido diferencias significativas entre los haplogrupos en la medida del grosor macular tras un año; en que la media del grupo JT resultó ser significativamente mayor que la media de los grupos U.

Vemos los valores de p en la tabla 40 según haplogrupos mtDNA. Los haplogrupos HV y U, tras un año de tratamiento, obtuvieron resultados mejores significativamente respecto al basal. Sin embargo, los haplogrupos JT y Otros, tras el tratamiento, no hubo diferencias significativas con los valores basales.

Valor de p				
Comparación GM	HV	U	JT	Otros
Basal-52semanas	<0,001	<0,001	1,000	0,083

Tabla 42. Comparación de grosor macular entre basal y 52 semanas según haplogrupos de mtDNA y valor del estadístico (p).

***TABLA CON LOS TAMAÑOS DE EFECTO POR HAPLOGRUPOS mt-DNA.**

La interpretación de este “r” es la siguiente:

Valores en torno a 0,10 = Tamaño del efecto PEQUEÑO

Valores en torno a 0,30 = Tamaño del efecto MEDIO

Valores en torno a 0,50 = Tamaño del efecto GRANDE

	Comparaciones por pares de grupos en cada momento					
	HV-U	HV-JT	HV-Otros	U-JT	U-Otros	JT-Otros
GM basal	0,10	0,14	0,07	0,05	0,25	0,35
GM 16 semanas	0,15	0,03	0,07	0,05	0,22	0,25
GM 52 semanas	0,29	0,25	0,10	0,49	0,46	0,33
	Comparaciones por pares de medidas en cada grupo					
	Pre – Post		Pre – Año		Post – Año	
Grupo HV	0,53		0,41		0,22	
Grupo U	0,50		0,50		0,13	
Grupo JT	0,51		0,19		0,45	
Grupo Otros	0,56		0,53		0,45	

Tabla 43. Valor del tamaño del efecto del Grosor Macular en las comparaciones por pares de medidas por grupo y tiempo.

-Clasificación de la respuesta al tratamiento-

Respuesta funcional: medida en núm. de letras de ETDRS:

Respondedores al tratamiento: ganancia de al menos cinco o más letras

- Tras dosis de carga: haplogrupos HV, U y JT.
- Tras 52 semanas: haplogrupos HV y U.

Pobres respondedores o no respondedores: ganancia de menos de 5 letras.

- Tras dosis de carga: haplogrupo Otros.
- Tras 52 semanas: haplogrupo JT y Otros.

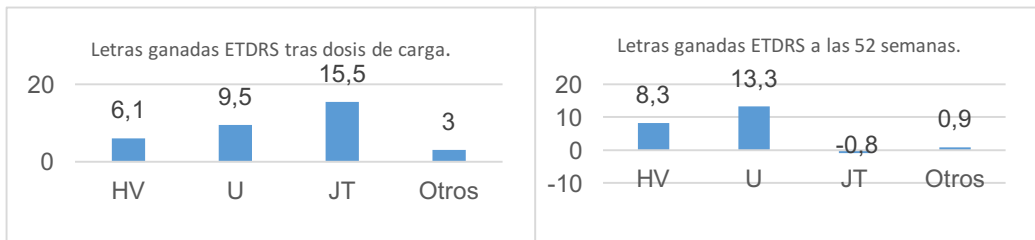


Gráfico 20. Número de letras ganadas en ETDRS según haplogrupos de mtDNA tras la dosis de carga y tras 52 semanas de

Respuesta morfológica: medida en grosor retiniano en um:

Respondedores al tratamiento: reducción de al menos el 25% del grosor retiniano.

En términos de GFC:

- Tras dosis de carga: haplogrupos HV, U, JT y Otros.
- Tras 52 semanas: haplogrupos HV y U.

En términos de GM:

- Tras dosis de carga: Haplogrupos HV, U, JT y Otros.
- Tras 52 semanas : haplogrupos HV, U y Otros.

Pobres respondedores o no respondedores: reducción de menos del 25% del grosor.

En términos de GFC:

- Tras dosis de carga: ningún haplogrupo.
- Tras 52 semanas: haplogrupo JT.

En términos de GM:

- Tras dosis de carga: ningún haplogrupo.
- Tras 52 semanas: haplogrupo JT.

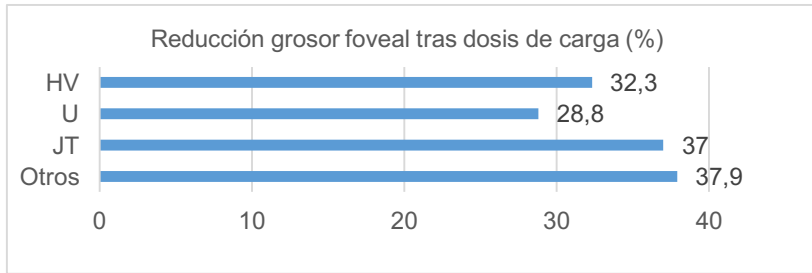


Gráfico 21. Reducción (%) del grosor foveal tras la dosis de carga según haplogrupos de mtDNA.

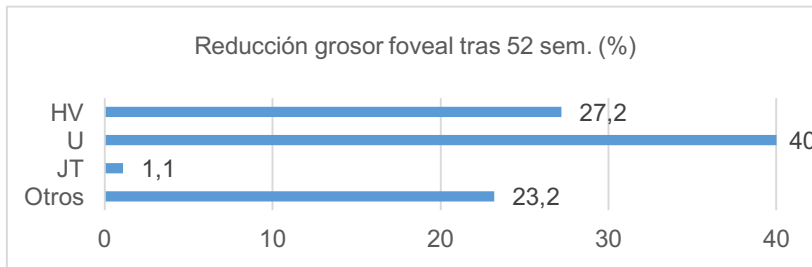


Gráfico 22. Reducción (%) del grosor foveal tras 52 semanas de tratamiento según haplogrupos de mtDNA.

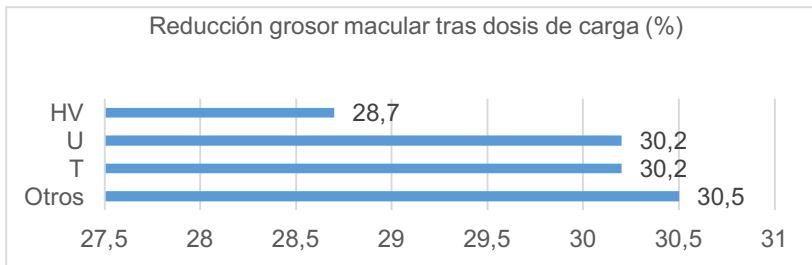


Gráfico 23. Reducción (%) del grosor macular tras la dosis de carga según haplogrupos de mtDNA.

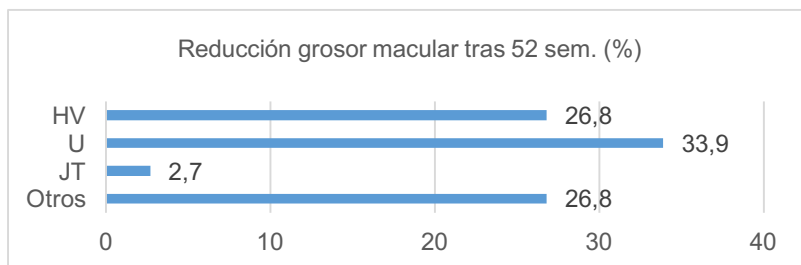


Gráfico 24. Reducción (%) del grosor macular tras 52 semanas de tratamiento según haplogrupos mtDNA.





DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN:

En la presente tesis analizamos si las diferencias que existen en la respuesta al tratamiento con ranibizumab intravítreo pueden estar asociadas con la pertenencia a un determinado haplogrupo de mtDNA.

1. Características poblacionales.

La media de edad de nuestros pacientes con DMAE exudativa se cifró en $76,9 \pm 7,5$ años, cifra similar a la de otros estudios.^{20,55,56} Se ha dividido la población a estudio en cuatro subgrupos en dependencia, según características filogenéticas, del haplogrupo de DNA mitocondrial (mtDNA) al que pertenecían: HV, JT, U y Otros (los que no fueron ni HV, ni JT ni U). No se apreciaron diferencias significativas entre la media de edad de los cuatro haplogrupos.

En cuanto a la distribución por género de los pacientes, se constató un mayor número de mujeres que de hombres, hecho también informado en otros estudios.^{20,22} Dicha diferencia se repartía por igual entre los distintos haplogrupos, sin mostrar significación estadística ($p=0,691$). También se analizó la posible contribución a la enfermedad de otros factores de riesgo, tales como HTA ($p=0,868$), el tabaco ($p=0,641$), la diabetes mellitus ($p=0,21$) o la dislipemia ($p=0,648$), no encontrándose diferencias significativas entre los haplogrupos.

Respecto a las características de la patología a estudio, tales como la agudeza visual ($p=0,387$), grosor foveal ($p=0,426$), grosor macular ($p=0,387$), áreas de afectación foveal ($p=0,336$), áreas de afectación macular ($p=0,355$) y tipo de membrana neovascular ($p=0,187$), tampoco hubo diferencias significativas entre los distintos haplogrupos de mtDNA en estado basal..

Con todos estos datos, podemos decir que la muestra a estudio presentaba características basales similares, y, por lo tanto, partimos de una muestra homogénea y comparable entre sí, por lo que la pertenencia a uno u otro haplogrupo no implica diferencias significativas en ninguna de las variables a estudio.

2. Comparabilidad de los resultados en términos de AV: respuesta funcional.

El presente estudio evidencia que la AV basal media de los pacientes al inicio del tratamiento fue de $46,1 \pm 19,5$ letras ETDRS, algo más baja que la de otros ensayos clínicos como MARINA,²⁰ SUSTAIN²⁴ o EXCITE,²² que hablan de AV iniciales de 53,6 , 55,8 o 56,1 letras ETDRS, respectivamente. Sin embargo, estudios en práctica clínica real,^{57,58} similares al nuestro y con una menor selección de pacientes, refieren AV inferiores y más cercanas a las aquí informadas; esto es, entre 32,7 y 49,2.

La ganancia media en términos de AV tras la dosis de carga fue de 9 letras de media y tras 1 año de tratamiento la media fue de 7,8 letras, requiriendo un total de 6,7 inyecciones de ranibizumab de media. El estudio HARBOR, ensayo fase III, aleatorizado, multicéntrico y cuyo diseño prospectivo implicaba el tratamiento con ranibizumab 0,5mg en dosis de carga y PRN posterior, demostró una ganancia similar de 8,2 letras a los 12 meses y una media de 7,7 inyecciones en total.²⁹ Otros trabajos en práctica clínica real,⁵⁹ obtuvieron una ganancia de 10 letras tras la dosis de carga y de 7 letras al año de tratamiento, con 4,4 inyecciones de media. Por su parte, Williams y cols.⁵⁸ obtuvieron al año una mejoría de 9,9 letras tras 6,8 inyecciones de media.

Si analizamos el número de letras ganado tras la dosis de carga en los distintos haplogrupos de mtDNA se evidencia que HV, JT y U obtuvieron

ganancias significativas, siendo el grupo Otros el único que no mostró esa mejoría. Sin embargo, al analizar las AV tras la dosis de carga entre haplogrupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,485$) entre ellos.

Si bien el haplogrupo JT, con hasta tres líneas ETDRS de mejoría, fue el que más letras ganó de media respecto a los otros haplogrupos. Por contra, el haplogrupo “Otros” fue el que menor AV consiguió tras la dosis de carga, obteniendo una ganancia de apenas tres letras de media. Una explicación podría ser que la media de AV basal de los pacientes del haplogrupo JT fue la más baja (44,8 letras ETDRS) y, por lo tanto, partían con la posibilidad de un mayor margen de mejoría. Al contrario sucedía con el haplogrupo “Otros”, con una AV basal superior (57 letras ETDRS) y menor margen de mejora. Esta característica ya fue descrita en otros estudios mediante análisis multivariante, en donde se corrobora que una AV inicial baja al inicio se asocia con una mayor ganancia visual neta tras el tratamiento⁶⁰. O lo que se viene en llamar “*efecto techo*” y “*efecto suelo*”, esto es, que aquellos pacientes con mejor AV inicial es más probable que vean estabilizar su visión logrando menores mejorías, que aquellos con peor AV basal. Por otro lado, en los pacientes que parten de buenas AV iniciales, la probabilidad de pérdida de más de tres líneas de visión es mayor que aquellos con una AV basal baja.⁶¹

Al observar el comportamiento visual a las 52 semanas de seguimiento, se observa una evolución visual dispar entre los haplogrupos. Vemos como el haplogrupo U es el que alcanza la mayor AV y el JT la peor, existiendo una diferencia clínicamente relevante (tamaño del efecto; $r=0,42$) entre ambos grupos de hasta 20 letras. Así, los pacientes del haplogrupo JT experimentaron un considerable empeoramiento visual respecto a lo ganado tras la dosis de carga, perdiendo hasta tres líneas del ETDRS y quedando con una AV a las 52 semanas incluso inferior a la basal. Sin embargo, los haplogrupos HV y U conservaron el número de letras ganadas tras la dosis de carga e incluso

mejoraron en 2,2 y 3,8 letras respectivamente. Cabe destacar el haplogrupo Otros, que partía de la mejor AV y, aunque no logró una gran mejoría visual tras la dosis de carga, si consiguió conservar dicha visión hasta la finalización del estudio.

Uno de los parámetros a estudio destacado en otros trabajo es el porcentaje de pacientes que ganaron más de 15 letras ETDRS. El 29% de nuestros pacientes lo consiguieron tras un año de tratamiento, resultados comparables con otros estudios de práctica clínica real, como el 20% logrado por Arias y cols.,⁵⁹ el 30-35% del estudio de Williams y cols.,⁵⁸ el 33% de Subramanian⁵⁷ o el 33% obtenido en un subanálisis del ensayo MARINA.⁶²

Respecto al porcentaje de pacientes que perdieron menos de 15 letras desde el inicio del tratamiento, en nuestro estudio fue el 89,2%, algo menor si lo comparamos con otros estudios^{25,29,63} que emplearon el mismo protocolo de tratamiento con ranibizumab 0,5mg en PRN y que osciló entre 90,3% , 94,5% o el 95,4% respectivamente.

Hemos de tener en cuenta que entre la dosis de carga y la semana 52 fueron excluidos 18 pacientes por diferentes motivos: asociar otras patologías oculares concomitantes (tres pacientes); cambiar la terapia de ranibizumab por otro fármaco anti-VEGF (cinco pacientes); aquellos que desarrollaron una cicatriz disciforme (dos pacientes); motivos personales y de salud que les impidieron continuar el tratamiento o no fueron regulares en la asistencia a la consulta tal y como estaba previsto en el protocolo (ocho pacientes). Sin embargo, como se ve en el apartado resultados, esto se tuvo en cuenta a la hora de reevaluar las características basales en función de haplogrupos. Esta tasa de seguimiento del 80,2% tras un año de tratamiento es similar a la informada en otros estudios de práctica clínica real con el mismo régimen de tratamiento PRN,^{57,64-66} que osciló entre el 78,6% y el 87,2%, y en los que se describieron motivos de pérdida de seguimiento de pacientes similares a los nuestros.

3. Comparabilidad de los resultados en términos de grosor retiniano medido por OCT: respuesta morfológica.

Otra de las variables estudiadas mediante SD-OCT fue el grosor foveal central (GFC). En nuestro caso, los pacientes partían de espesores medios mediante SD-OCT en torno a $380 \pm 99 \mu\text{m}$. Revisando la literatura, constatamos que otros grandes estudios multicéntricos, randomizados y aleatorizados en pacientes *naive* con DMAE exudativa presentaban grosores similares, que oscilaban entre los $340 \pm 100 \mu\text{m}$ y los $386 \pm 145 \mu\text{m}$.^{24,59,67-69} No apreciamos diferencias significativas entre las medias del GFC entre los diferentes haplogrupos ($p=0,426$), por lo que consideramos que los pacientes mostraban características basales similares.

Tras un año de tratamiento y una media de $6,7 \pm 1,7$ inyecciones, el GFC medio disminuyó de $380 \pm 99 \mu\text{m}$ a $281 \pm 98 \mu\text{m}$, lo que supone una reducción del 26%. Otros estudios con idéntico protocolo de tratamiento⁵⁹ informaron una reducción de $340 \mu\text{m}$ a $276 \mu\text{m}$ tras 4,4 inyecciones de media. Krebs y cols.⁶⁸ hablan de una disminución de de $365 \mu\text{m}$ a $275 \mu\text{m}$. Muether publicó a 12 meses una reducción de de 438 a $322 \mu\text{m}$ tras 6,92 inyecciones de media,⁶⁶ y finalmente la reducción de $162 \mu\text{m}$ descrita por el grupo HARBOR²⁹ tras un año de tratamiento con 7,7 inyecciones de media.

Tras la dosis de carga, todos los haplogrupos estudiados mejoraron significativamente su GFC, cifrándose en más de $100 \mu\text{m}$ la reducción media y no hallando diferencias significativas entre haplogrupos a las 16 semanas. No obstante, al comparar los GFC basales y al final del estudio (a las 52 semanas), dicha disminución solo fue estadísticamente significativa para los haplogrupos HV ($106,1 \mu\text{m}$) y U ($143,8 \mu\text{m}$). Por el contrario, el haplogrupo "Otros", si bien experimentó una mejoría de hasta $86,2 \mu\text{m}$, ésta no fue estadísticamente significativa. Caso diferente fue el de los individuos con haplogrupo JT, donde la mejoría experimentada tras la dosis de carga no se

mantuvo durante el año de tratamiento, regresando a valores similares al basal tras 7,1 inyecciones de media. Similar respuesta se obtuvo en el grosor macular (GM) como se puede ver en el apartado de resultados.

Al realizar el estudio a las 52 semanas, vemos como el grupo JT fue significativamente diferente al U tanto en GFC como en GM.

Así pues, debemos destacar la diferente respuesta en términos de GFC y GM de los individuos del haplogrupo JT respecto a los demás subgrupos. Sobre todo las diferencias halladas entre el haplogrupo JT y el U. Una vez descartadas diferencias en los valores basales que pudieran justificar esta diferente evolución, comprobando que recibieron de media el mismo número de inyecciones y que el cumplimiento de los pacientes fue el adecuado, cabe hipotetizar si los haplogrupos de mtDNA pueden predisponer a una diferente respuesta a ranibizumab. Además de pensar, si el tratamiento de los pacientes del haplogrupo JT no fue el óptimo y si hubieran respondido mejor al tratarlos de forma más intensa o con otro protocolo para lograr resultados similares a los de los otros haplogrupos.

4. Tipos de respuesta al tratamiento.

Los factores que influyen en la respuesta al tratamiento aún no han sido claramente identificados. Los distintos estudios publicados muestran una gran variedad de respuestas al tratamiento y de formas de clasificarlas, siendo difícil predecir los resultados visuales o morfológicos de cada paciente a largo plazo.^{23,70-72} Se ha visto como una proporción de pacientes requieren inyecciones mensuales y, aún así, no se consigue eliminar el fluido macular medido con OCT entre inyecciones.^{25,26} Incluso en los estudios protocolizados y con buena adherencia al tratamiento, muchos pacientes se muestran “refractarios” a la terapia intravítrea con antiangiogénicos.⁵ Asimismo, también

existen discrepancias conceptuales respecto a la “refractariedad”, “recurrencia”, mala respuesta al tratamiento, la catalogación de no respondedores, pobres respondedores, respondedores parciales o respondedores tardíos. El hecho es que se ha visto que existen importantes diferencias interindividuales en la respuesta a un mismo agente anti-VEGF y, actualmente, seguimos sin consenso en cuanto a la forma de clasificar la respuesta óptima o la ausencia de respuesta a estas terapias.⁷³

Los dos parámetros más usados a la hora de cuantificar la respuesta al tratamiento son la AV (respuesta funcional) y el grosor foveal medido mediante OCT (respuesta morfológica)⁶⁰. Además, se ha visto que la respuesta morfológica y funcional pueden no estar correlacionadas entre sí.⁷⁴ Esta discrepancia anatómo-funcional obliga a combinar ambas variables para determinar mejor el resultado. El tratamiento con un agente anti-VEGF puede reducir el líquido retiniano, pero éste puede haber destruido en parte el tejido retiniano o la propia cicatrización de la membrana una vez inactiva. Así, aunque se pueda recuperar el grosor retiniano central con nuevas dosis de fármaco intravítreo, no se recupera la funcionalidad.²⁴

En este sentido, el Royal College of Ophthalmologists (RCOphths) elaboró una guía donde se recomiendan ambos parámetros, funcionales (medidos en AV) y morfológicos (medidos mediante OCT), para guiar el manejo de estos pacientes.⁷³

Los primeros grandes estudios pivotaes publicados, tales como MARINA²⁰ y ANCHOR,⁵⁵ establecieron la pérdida de menos de tres líneas ETDRS como criterio para poder hablar de estabilización. En aquellos pacientes que mostraban una pérdida mayor se consideraba la respuesta insuficiente. De los que habían tenido una respuesta insuficiente, considerados no respondedores, el 77% presentaban una pérdida de más de tres líneas y el 83 % presentaba un incremento del grosor retiniano central. Más tarde, otros estudios como

SUSTAIN²⁴ o EXCITE²² sugirieron que la respuesta al tratamiento a largo plazo podía no reflejar siempre el resultado visual obtenido tras la fase de carga.

También García-Layana y cols.⁶⁰ destacaron la importancia de definir la respuesta al tratamiento a corto y largo plazo para individualizar las terapias.

La tasa de respuesta varía según estudios. Mientras unos hablan de que el 10% de los pacientes no respondieron a la terapia a los 12 meses, considerando como tal una AV de 20/200 o peor;²⁰ Suzuki y cols.,⁷⁵ en un estudio retrospectivo de 141 pacientes, constataron hasta un 14,9% de no respondedores tras 12 meses de tratamiento en términos de AV; llegando a alcanzar hasta el 17% la cifra de no respondedores en términos de hallazgos funduscópicos en un estudio llevado a cabo con ranibizumab en pauta PRN durante 12 meses. En este caso consideraron como no respondedores a los pacientes que al año de tratamiento presentaban una AV inferior a 0,2 en la escala logMar. Siendo los no respondedores a nivel funduscópico los que presentaban a 12 meses hallazgos exudativos (desprendimiento del epitelio pigmentario, fluido subretiniano, edema macular o hemorragia) o mostraban un incremento superior a 100 micras en OCT con respecto a los valores basales.

Yamashiro y colaboradores,⁷⁶ observaron que el 14% de los pacientes eran no respondedores, considerando que no hubo una mejoría significativa de la AV al año de tratamiento. Kruger Falk y cols.⁷⁷ informaron de un 15%. Un estudio recientemente publicado, defiende la clasificación de respondedores o no respondedores al tratamiento tras la dosis de carga, e identifica a los respondedores como aquellos que mejoraron su agudeza visual respecto a la basal y como no respondedores aquellos que no mejoraron o incluso empeoraron, sin tener en cuenta el componente retiniano para su diagnóstico. Sin embargo, afirman que la evaluación tras la dosis de carga puede ser demasiado precoz a la hora de predecir respuesta a largo plazo.⁷⁸

Por su parte, Amoaku y cols.⁷⁹ propusieron definir la respuesta al tratamiento en varios tipos: buena, parcial, pobre o no respuesta tomando

criterios funcionales y morfológicos. Considerando como no respuesta o pacientes refractarios al tratamiento a aquellos que no presentaban cambios o incluso experimentaron un incremento en el grosor retiniano central, presencia de fluido subretiniano o intrarretiniano. A nivel funcional, la no respuesta la catalogaron como empeoramiento de la visión respecto a la basal. No obstante, establecieron además dos momentos de la evaluación para medir esa respuesta. Definieron una respuesta primaria después de la dosis de carga de antiangiogénico (a las 4 semanas desde la última inyección de la dosis de carga) y la respuesta secundaria o de mantenimiento o a largo plazo (entre la semana 16 y 52), y afirmaron que la respuesta primaria no es siempre predictiva de la secundaria y que una proporción de pacientes evolucionan sin mostrar una correlación con la respuesta primaria. De hecho, estudios como ANCHOR,⁵⁵ MARINA,²⁰ PIER,⁸⁰ SUSTAIN²⁴ o EXCITE²² ya habían sugerido que la respuesta al tratamiento a largo plazo no siempre refleja los resultados obtenidos tras la fase de carga.⁷⁹ Recientemente Iacono y cols.⁸¹ han definido a los no respondedores de acuerdo con una categoría funcional (empeoramiento de al menos 2 líneas de ETDRS) y anatómicos (no hay una disminución del espesor de al menos el 10% respecto a la cifra basal).

En el presente estudio hemos considerado ambos parámetros -AV y grosor retiniano- a la hora de clasificar a nuestros pacientes, explorando la respuesta terapéutica en dos momentos concretos: tras la dosis de carga (respuesta primaria o a corto plazo, a las 16 semanas del inicio del tratamiento) y tras un año de seguimiento (respuesta secundaria o a largo plazo, a las 52 semanas del inicio del tratamiento).

Respuesta funcional: medida en número de letras de ETDRS:

-Respondedores al tratamiento: ganancia de al menos 5 o más letras

-Pobre respondedores o no respondedores: ganancia de menos de 5 letras.

Respuesta morfológica: medida en grosor retiniano en μm :

-Respondedores al tratamiento: reducción de al menos un 25% del espesor retiniano.

-Pobres respondedores o no respondedores: reducción inferior al 25% del espesor retiniano.

Atendiendo a nuestra clasificación, en cuanto a la respuesta funcional, tras la dosis de carga, los haplogrupos HV, JT y U respondieron a la fase de carga con anti-VEGF. Tras las 52 semanas de tratamiento, sólo podemos considerar respondedores al tratamiento los haplogrupos HV y U, siendo no respondedores en este punto del estudio tanto el haplogrupo JT como “Otros”.

En cuanto a la respuesta morfológica, tanto en términos de grosor retiniano foveal o macular, todos los haplogrupos redujeron de media más de un 25% su espesor retiniano tras la dosis de carga, siendo catalogados todos los haplogrupos como respondedores. Sin embargo, a las 52 semanas del inicio del tratamiento sólo los pacientes de los haplogrupos HV y U mantuvieron esa reducción y, por lo tanto, se consideraron respondedores.

Sin embargo, los pacientes del haplogrupo JT volvieron a grosores foveales y maculares similares a los basales, por lo que deden ser considerados no respondedores tras un año de tratamiento.

En nuestro caso, vemos como la respuesta primaria no fue sinónimo de la respuesta secundaria, y que la respuesta funcional no siempre se correlacionó con la respuesta morfológica. El 10,4% de los que no respondieron tras la fase de carga sí lo hicieron tras los 12 meses de tratamiento en pauta PRN.⁶⁸ Otros autores hablan de que, aproximadamente, el 70% de los pacientes que inicialmente fueron clasificados como no respondedores “anatómicos”,

fueron reclasificados como respondedores durante el seguimiento. Asimismo, el 50% de aquellos clasificados como no respondedores funcionales fueron reclasificados como respondedores. Y sólo un 4% fueron catalogados como “respuesta no completa” tras no responder tampoco a largo plazo.⁸¹ Podemos observar como las definiciones de respuesta al tratamiento que da la literatura es amplia y diversa.

Con estos resultados demostramos que los pacientes se comportaron de diferente manera tras un año de tratamiento según su haplogrupo de mtDNA. Quizá si hubiésemos sabido a priori que los pacientes JT iban a responder peor, hubiésemos aumentado el número de inyecciones o realizado un tratamiento en régimen mensual. Por lo que en nuestro caso, la pertenencia a uno u otro haplogrupo sí podría definirnos la respuesta al tratamiento y quizá servirnos como factor a tener en cuenta antes de plantearnos la pauta de tratamiento a seguir.

5. Implicaciones pronósticas y terapéuticas de los diferentes subtipos neovasculares.

Ya desde los primeros estudios en pacientes con DMAE neovascular en tratamiento con fármacos anti-VEGF se intentó relacionar la diferente respuesta al tratamiento con el subtipo de membrana neovascular.^{17,82} Así, en 2006, Jonas y cols.⁸³ evaluaron si existían diferencias en cuanto al pronóstico funcional a tres meses en los diferentes subtipos de membranas neovasculares tratadas con una única inyección de bevacizumab. Obtuvieron ganancias medias de $0,4 \pm 2,5$ líneas ETRS, similares en todos los subtipos neovasculares sin existir ninguna correlación entre el tipo de membrana neovascular y la respuesta terapéutica. No obstante, tras los resultados de los estudios MARINA²⁰ y ANCHOR,⁵⁵ se vio que los pacientes con neovascularizaciones (NVC) tipo 1 presentaban una mejor AV basal que las NVC tipo 2 y, sin embargo,

conseguían menores ganancias visuales. Esta reducida mejoría funcional se atribuyó a un efecto negativo del tratamiento fijo.⁸⁴ Las lesiones NVC tipo 1 se han asociado, clásicamente, con una mayor estabilidad en su curso y un mejor pronóstico visual.^{13,84} Por el contrario, las lesiones tipo RAP o NVC tipo 3 se relacionan con un curso más agresivo, asociado a exudación y hemorragias recurrentes, y con una mayor tasa de bilateralización.⁸⁵

Uno de los estudios con mayor tiempo de seguimiento fue el publicado por Mrejen S y cols.,⁸⁶ que realizaron un subanálisis de los resultados obtenidos según los diferentes tipos neovasculares. Concluyeron que las NVC tipo 1 conseguían una ganancia visual que se mantenía al finalizar el seguimiento. En el resto de lesiones se apreciaba una ganancia inicial seguida de un deterioro visual progresivo a partir de los 18 meses. Por todo ello, concluyeron que, a pesar de que las NVC tipo 1 parecían necesitar un mayor número de inyecciones, a largo plazo presentaban mejores visiones que el resto de lesiones. Además, en un subanálisis del estudio CATT,⁸⁷ las neovascularizaciones tipo RAP (diagnosticadas según criterios únicamente angiográficos), a pesar de recibir un menor número de inyecciones que el resto de lesiones en el grupo PRN, presentaban mayores ganancias visuales y mayor reducción del grosor central en la OCT al final del primer año. Sin embargo, los resultados a 2 años mostraron que finalmente el deterioro visual del subtipo RAP se igualaba al resto de procesos neovasculares. En nuestro caso, y de forma similar a otros estudios, encontramos un mayor número de membranas tipo 1 y aunque analizamos el tipo de membrana neovascular que presentaban nuestros pacientes a priori, no se encontraron diferencias significativas entre los haplogrupos.

6. Factores predictores de respuesta.

Se habla de predictores de respuesta terapéutica, atribuyéndose la respuesta a largo plazo del tratamiento a la mala función visual inicial, la mayor edad al diagnóstico, la pobre respuesta tras la dosis de carga y la extensión de las áreas de afectación retiniana.^{88,89} En nuestro estudio se han analizado todos estos factores en relación con el haplogrupo mtDNA de pertenencia, sin encontrar diferencias significativas.

Por otro lado, la literatura habla de otros factores clínicos que pueden afectar la respuesta terapéutica a largo plazo, como la cronicidad de la enfermedad, que produce acúmulo de citoquinas, inflamación crónica y altos niveles de VEGF en el tiempo.⁷⁹ Estas causas metabólicas como posibles factores modificadores de la respuesta, provocan diferencias en la absorción del fármaco, distribución de su metabolismo o disminución de su efectividad. En este sentido, pueden incluirse los receptores celulares o las alteraciones en la regulación de las citoquinas. La resistencia a las terapias antiVEGF en cáncer está bien estudiada y reconocida, creyendo ser debida en esos casos a señales angiogénicas.⁹⁰⁻⁹²

Se han descrito múltiples genes nucleares que podrían predecir el desarrollo de la enfermedad, e incluso se han descrito marcadores genéticos como posibles predictores individuales de la respuesta a la terapia antiangiogénica. Se ha intentado identificar genes nucleares como algunos SNPs del CHC asociados a una peor respuesta terapéutica, así como formas más severas de DMAE exudativa,^{89,93} sobre todo en pacientes homocigotos con respecto a los heterocigotos. Otros autores, han asociado el genotipo CC rs1061170 de CF a una mejor respuesta a tratamiento.⁹⁴ Hay algunos estudios que han tratado de asociar determinados factores genéticos nucleares a la respuesta a la terapia intravítrea.⁹⁴

La teoría que proponen algunos de estos autores sostiene que determinados patrones genéticos pueden modular el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios a través de proteínas específicas y podrían, potencialmente, desarrollar lesiones clínicamente diferentes, comportándose de una forma más o menos agresiva y responder de forma diferente a un mismo tratamiento. También que debería tenerse en cuenta que los resultados en estudios de práctica clínica real son peores, pues es menos rigurosa la adherencia al tratamiento; y en este sentido que en la vida real los pacientes con factores de riesgo genéticos puedan ser más vulnerables y peores respondedores a los anti-VEGF, requiriendo una adherencia más estricta.⁹³

7. Haplogrupos de mtDNA y genética mitocondrial.

En nuestra muestra de población caucásica autóctona de Aragón, analizamos los haplogrupos más frecuentes: HV, U y JT. Encontramos un 58% con patrón HV, un 19% con patrón U, un 12,2 % con patrón JT y un cuarto grupo de pacientes que no fueron ni HV, ni U, ni JT (10,2%) a los que englobamos en el grupo Otros. Estudios poblacionales de haplogrupos mitocondriales en nuestro país, muestran similares resultados,⁹⁵ encontrando entre el 56,6-59,1% de HV, 19,1-22,6 % de U y 13-15,9% de JT. Si comparamos nuestros resultados con otros estudios poblacionales a nivel mundial, podemos comprobar como nuestra muestra tenía características similares a las atribuidas a la población europea, encontrando el mayor porcentaje de pacientes con el haplogrupo H, pues se considera el más frecuente en la población caucásica de Europa occidental.⁹⁶ Richards y cols.⁹⁷ hallaron un 47% de HV, 21,9% de U y 18,7 de JT. Jones y cols.,⁴⁰ en población caucásica australiana de pacientes con DMAE, encontraron un 42,9% de H, seguido de un 19% de JT y un 14,2 % de U. Observamos como nuestra muestra presentó un patrón similar a otros estudios publicados en relación a la distribución de los haplogrupos. No encontramos

diferencias significativas entre haplogrupos respecto a los parámetros estudiados como edad, sexo, HTA, tabaquismo, diabetes mellitus o dislipemia. En cuanto a las características clínicas de la DMAE exudativa, no encontramos diferencias entre haplogrupos en cuanto al tipo de membrana, el área de afectación retiniana o la afectación foveal al diagnóstico, así como en la AV, grosor macular o foveal medido por OCT al diagnóstico. Sin embargo, sí encontramos diferencias entre haplogrupos en la evolución de la enfermedad al ser tratados en mismas condiciones con la terapia antiVEGF (ranibizumab). Los individuos del haplogrupo JT, tratados durante un año con este fármaco, mostraron valores de grosor foveal central (GFC) y valores de agudeza visual similares a los anteriores al tratamiento a diferencia del resto de haplogrupos. Además, los individuos del haplogrupo U mostraron valores de GFC a los doce meses significativamente más bajos que los del haplogrupo JT y también significativamente más bajos que sus valores antes del tratamiento.⁹⁸

El tema de la presente tesis, recientemente publicado, es el primer trabajo en la literatura médica que determina que el fondo genético del DNA mitocondrial (mtDNA) puede jugar un papel importante en la diferente respuesta al tratamiento con ranibizumab que experimentan los pacientes con DMAE exudativa.

Se ha hablado del efecto saturación del tratamiento con inyecciones de ranibizumab estimando que se produzca entre 6,8 y 7,2 inyecciones.⁹⁹ En este sentido, se ha hablado también del término taquifilaxia que describe una disminución en la respuesta a un fármaco después de su administración y que no se puede superar aumentando la dosis.¹⁰⁰ Se atribuye este hecho a que con el uso de estos fármacos anti-VEGF se puede desarrollar tolerancia farmacocinética y farmacodinámica durante el tratamiento y puede ser causada por un cambio en la expresión de VEGF y de sus receptores.¹⁰⁰ Podríamos pues atribuir el mayor número de inyecciones a casos refractarios o que ya no responden bien al ranibizumab buscando así otros enfoques.

Como ya hemos comentado en la introducción, los haplogrupos de mt-DNA describen grupos de genotipos de mtDNA relacionados filogenéticamente. Combinaciones particulares de polimorfismos de población de mtDNA que definen los haplogrupos de mtDNA y tienen comportamientos metabólicos diferentes. Este mtDNA no solo codifica las subunidades del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS): 7 del complejo respiratorio I (CI) - p.MT-ND1-6 y 4; 1 del complejo respiratorio III (CIII) - p.MT-CYB; 3 del complejo respiratorio IV (CIV) - p.MT-CO1-3; y 2 de la ATP sintasa (CV) - p.M-ATP6,8. También codifica los RNA necesarios para su expresión. Entonces, estas variantes genéticas definitorias de cada haplogrupo afectan la función del sistema OXPHOS.

Nuestros hallazgos sobre la asociación de haplogrupos de mtDNA y el resultado de la terapia con ranibizumab en DMAE podrían atribuirse a la hipótesis de una relación entre la capacidad de OXPHOS y la concentración de VEGF en los diferentes haplogrupos.

8. Sistema OXPHOS y angiogénesis.

-Los inhibidores de OXPHOS aumentan la angiogénesis-

Se ha demostrado que el tratamiento de los pericitos microvasculares del cerebro humano con el inhibidor del CIV cianuro dio lugar a una mayor expresión de VEGF.¹⁰¹ Este inhibidor aumentó la producción de proteína VEGF en la línea celular monocítica U-937 humana.¹⁰² También se ha visto que el tratamiento previo in vitro de células estromales derivadas de tejido adiposo humano con inhibidores de CI, rotenona o de CIII, antimicina, incrementó la secreción de VEGF y, después de su inyección en ratones, la puntuación angiográfica y la densidad capilar.¹⁰³ El inhibidor de CI ,1-metil-4-

fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), se usa frecuentemente para modelar la enfermedad de Parkinson. Este compuesto aumentó el número de neuronas que expresan VEGF y el número de vasos sanguíneos en la sustancia negra de monos parkinsonianos.¹⁰⁴

Así pues, se ve como una disfunción mitocondrial o menor actividad mitocondrial debida a inhibidores de OXPHOS eleva los niveles de VEGF. Como ya hemos comentado, existe una diferente función de OXPHOS según el haplogrupo de mtDNA de pertenencia, podríamos deducir que la pertenencia a un determinado haplogrupo podría ser un factor predisponente a una diferente tasa de expresión de VEGF y, por lo tanto, diferente respuesta a la terapia anti-VEGF.

-Las mutaciones en las subunidades de OXPHOS aumentan la angiogénesis-

Por otro lado, también se ha demostrado que las mutaciones en subunidades del complejo II (CII) respiratorio codificado por nDNA dieron como resultado una actividad disminuida de la CII, una mayor expresión del mRNA de VEGF y una estimulación de la vía angiogénica de los tumores de paraganglioma y feocromocitoma.^{105,106} De manera similar, las mutaciones en una subunidad del CIII codificada por nDNA también disminuyeron la función de OXPHOS y aumentaron la expresión de mRNA y proteína de VEGF en células HEK293 de riñón embrionario humano transfectadas con mutantes UQCRB.¹⁰⁷ Y también se ha demostrado que las células de hepatoma SK-Hep1 humanas que carecen de mt-DNA, células rho0, expresan más mRNA y proteína VEGF que las células parentales con mtDNA, células rho +. Además, el medio acondicionado de estas células rho0 aumentó la formación de estructuras tubulares a partir de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y nuevos vasos sanguíneos en ensayos de membrana corioalantoica.¹⁰⁸

Como ya hemos comentado en otros apartados, se usan líneas celulares mitocondriales, híbridos citoplásmicos o cíbridos para vincular con confianza un fenotipo de mtDNA. Estas células comparten el nDNA y difieren en su mtDNA. Al usar este modelo, se demostró que los cíbridos producidos a partir de células de carcinoma de pulmón de ratón, que albergan una mutación de CI y tienen un defecto de OXPHOS, mostraron un aumento en los niveles de mRNA y proteína de VEGF y una mayor actividad para inducir la neoangiogénesis que aquellos sin mutación de mtDNA.¹⁰⁹⁻¹¹¹

En pacientes con miopatías mitocondriales atribuibles a mutaciones de mtDNA heteroplásmicas, en las que el mtDNA mutado y de tipo salvaje coinciden, los niveles capilares musculares fueron el doble que en los sujetos sanos sedentarios y el área capilar fue mayor en pacientes con los defectos OXPHOS musculares más graves. Además, también se demostró que, dentro de cada paciente, el área capilar era más de dos veces mayor alrededor de los segmentos de fibra muscular con una función defectuosa en comparación con la función OXPHOS más preservada. La función OXPHOS inferior o superior probablemente refleja un porcentaje mayor o menor de mutación patológica del mtDNA, respectivamente. Por lo que parece claro, que la expresión de VEGF es paralela a la distribución capilar.¹¹² Además de los músculos, la proliferación vascular es una característica de los defectos mitocondriales en otros tejidos, especialmente en el sistema nervioso central de pacientes con síndrome de Leigh (LS). La base genética del LS es muy diversa y las mutaciones que causan esta enfermedad se han definido en los genes codificados con mtDNA y nDNA. Estos genes están asociados principalmente con la función OXPHOS.¹¹³

Más relacionada con la visión, la microangiopatía del disco óptico se ha descrito como una característica oftalmoscópica típica en el estado asintomático y agudo de individuos que albergan mutaciones de neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON). LHON es un tipo de ceguera que resulta de la disfunción y pérdida de las células ganglionares de la retina (RGC). Este

trastorno se debe principalmente a mutaciones patológicas en los genes de mtDNA que codifican las subunidades del CI. Curiosamente, el haplogrupo J de mtDNA aumenta el riesgo de LHON.¹¹⁴ Se ha demostrado recientemente que, cuando la densidad del vaso capilar peripapilar se normaliza para el grosor de la capa de fibra nerviosa de la retina, la red vascular en los sectores temporales aumenta en portadores de mutación de LHON no afectados. Esta observación sugiere que las consecuencias metabólicas de la insuficiencia mitocondrial probablemente producen una respuesta vascular compensatoria, que afecta principalmente el área del haz papilomacular.¹¹⁵

Todos estos resultados parecen sugerir que la deficiencia de OXPHOS promueve la angiogénesis. Para evitar el efecto de saturación del tratamiento con ranibizumab, para reducir su costo excesivo¹¹⁶ y los efectos secundarios potenciales moderados,¹¹⁷ tal vez la estimulación con OXPHOS reduzca la angiogénesis y se pueda usar como una posible terapia coadyuvante.

-La angiogénesis patológica es característica de alteraciones en el sistema OXPHOS-

Una angiogénesis patológica se ha visto en una gran cantidad de enfermedades,^{118,119} tanto oculares^{120,121} como reumáticas^{122,123} así como en el cáncer,¹²⁴ pudiendo compartir todas estas una misma causa común: la hipoxia como estímulo precipitante.¹²⁵⁻¹²⁷ Se sabe que ante la hipoxia crónica se produce una represión de la respiración mitocondrial,¹²⁸⁻¹³⁰ encontrándose alteraciones mitocondriales en muchas enfermedades con procesos angiogénicos.¹³¹ A diferencia de los tumores vasculares, en los tumores no vasculares se ha encontrado una alta expresión de proteínas asociadas a OXPHOS y a la biogénesis mitocondrial, observando que el metabolismo energético mitocondrial es diferente entre ambos.^{132,133}

El EPR en pacientes con DMAE muestra una disminución en el número y el área de las mitocondrias en comparación con los controles. Así como una

menor tasa de consumo de oxígeno a nivel mitocondrial en pacientes con DMAE en comparación con controles.¹³⁴ Quizá una disfunción en el sistema OXPHOS pueda incrementar la angiogénesis ya patológica por la propia enfermedad, entonces la variación de OXPHOS asociada a los haplogrupos de mtDNA puede ser un factor de susceptibilidad/resistencia para algunos aspectos de estas enfermedades relacionadas con la angiogénesis. De hecho, está informado como la capacidad de OXPHOS de los híbridos JT es más baja, con menor producción de ATP.¹³⁵ Este haplogrupo parece ser factor de susceptibilidad para desarrollar DMAE como se ha reportado en diferentes estudios ya comentados en esta tesis. En nuestro trabajo, individuos con DMAE exudativa con este haplogrupo han demostrado una peor respuesta al tratamiento con terapia con ranibizumab. Por otro lado, el haplogrupo U parece ser resistente al desarrollo de retinopatía diabética proliferativa^{136,137} e individuos del haplogrupo U con DMAE exudativa han demostrado una mejor respuesta al tratamiento con ranibizumab en nuestro estudio.

Estos resultados sugieren que la función OXPHOS pueda estar alterada en la DMAE en diferente grado según el haplogrupo mitocondrial y que de éste dependa algunos factores angiogénicos de la enfermedad.

-Mejorar la función de OXPHOS reduciría la angiogénesis-

Si los mecanismos subyacentes de las enfermedades con una angiogénesis patológica están relacionados por una disfunción en el sistema OXPHOS, las terapias frente a este factor podrían ser útiles para todas ellas. Por lo tanto, las intervenciones para mejorar la función del sistema OXPHOS tendrían aplicaciones clínicas generalizadas que podrían utilizarse en diferentes enfermedades con sustrato patológico en la angiogénesis.

Se han desarrollado dos tipos principales de fármacos antiangiogénicos: anticuerpos monoclonales (mAB) o moléculas relacionadas

dirigidas al VEGF o el dominio extracelular de su receptor; e inhibidores de la tirosin quinasa (TKI) dirigidos a los dominios de quinasa intracelular de VEGF. Recientemente se ha demostrado que moléculas relacionadas con mAB aumentaron la tasa de respiración en células epiteliales 19 del EPR del adulto (ARPE-19).¹³⁸ Además también se demostró que el metabolismo del tumor se reprogramó en respuesta al TKI, con aumento del metabolismo mitocondrial. El tejido tumoral tratado con TKI tenía una tinción para CII muy intensa y su capacidad respiratoria era mayor que la del tejido tumoral tratado con control.¹³⁹

En la bibliografía ya se han propuesto varios compuestos que actúan frente a diferentes objetivos celulares para aumentar la biogénesis mitocondrial.¹¹⁴ Algunos de estos compuestos también son beneficiosos para disminuir los procesos angiogénicos patológicos. Los polifenoles y las tiazolidindionas inhiben la angiogénesis ocular.^{116,117} En este contexto, la quercetina inhibió la formación de tubos de la línea celular endotelial retina coroides-retina¹⁴⁰⁻¹⁴¹ y la formación de neovascularización coroidea inducida por láser en ratas.¹⁴² Quizá estos compuestos podrían utilizarse junto con los fármacos antiangiogénicos como adyuvantes en enfermedades con angiogénesis patológica que tuvieran determinados haplogrupos de mtDNA de alto riesgo para su desarrollo.

9. Limitaciones del estudio.

La primera limitación fueron las características ambispectivas del mismo. Los pacientes fueron reclutados tanto en el momento del diagnóstico como iniciada la terapia con ranibizumab, siempre que cumplieran los criterios de inclusión y no exclusión. Fueron seguidos en el tiempo y los resultados analizados retrospectivamente tras 52 semanas de tratamiento.

Por otro lado, no se influyó en el régimen de tratamiento ni en la forma de administrarlo, pues en este caso se realizó pauta PRN tal como estaba protocolizado por el servicio en el momento de llevarse a cabo el estudio. Dicho régimen, no proactivo, está consensuado y aceptado por las guías clínicas para esta patología. Se mantuvieron criterios estrictos para la permanencia de los pacientes en el estudio, y de no cumplirse, se descartaron del estudio, para mantener la homogeneidad. Por esta razón reanalizamos la muestra a las 52 semanas, para tener en cuenta la pérdida de los sujetos durante el seguimiento.

Otra de las limitaciones es el tamaño muestral. En este caso fue un proyecto elaborado en coordinación con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, donde se fijaron fechas acotadas de reclutamiento de pacientes para el análisis del DNA mitocondrial. Debimos obtener en un plazo determinado el mayor número de pacientes con DMAE húmeda que cumplieran criterios de inclusión y no exclusión y que aceptaran participar en el estudio. Al clasificar la muestra en subgrupos en función de los haplogrupos, obtuvimos una disminución relativa del tamaño (n) en cada uno de los grupos, que posteriormente fueron analizados. Sin embargo, se mantuvo la proporcionalidad de la prevalencia de estos haplogrupos similar a la encontrada en la literatura médica.



CONCLUSIONES



Influencia de los haplogrupos de mtDNA en la respuesta a la terapia intravítrea con ranibizumab en pacientes con DMAE avanzada neovascular.

7. CONCLUSIONES

PRIMERA. Un año de tratamiento con ranibizumab en régimen PRN en pacientes con DMAE avanzada exudativa naïve constituye una opción terapéutica eficaz para mejorar la evolución de la enfermedad y obtener ganancias funcionales y anatómicas.

SEGUNDA. No se ha observado que los pacientes presenten diferencias en las variables a estudio (factores de riesgo, demográficos o forma clínica de presentación de la enfermedad) en estado basal según su haplogrupo mtDNA.

TERCERA. Tras la dosis de carga, todos los haplogrupos de mtDNA fueron respondedores al tratamiento, tanto en términos anatómicos como funcionales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre haplogrupos de mtDNA de pertenencia.

CUARTA. A las 52 semanas de tratamiento, los haplogrupos HV y U se comportaron como respondedores al tratamiento con ranibizumab, tanto en términos funcionales como anatómicos.

QUINTA. A las 52 semanas de tratamiento, el haplogrupo JT se comportó como no respondedor al tratamiento, ni en términos funcionales ni anatómicos.

SEXTA. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la respuesta funcional (AV) obtenida entre haplogrupos de mtDNA a las 52 semanas de tratamiento.

SÉPTIMA. Si hubo diferencias estadísticamente significativas en la respuesta anatómica (GFC y GM) entre haplogrupos de mtDNA a las 52 semanas de tratamiento: El haplogrupo JT se comportó significativamente peor que el haplogrupo U.



ANEXOS



8. ANEXOS.

Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa"
Servicio de Oftalmología
Zaragoza

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular
y Celular. Universidad de Zaragoza.

Datos del paciente:

Apellidos

Nombre

Sexo Fecha de nacimiento

Afiliación Nº Historia

Domicilio

Población Teléfonos

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS GENÉTICAS Y
MOLECULARES EN EL ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD
(D.M.A.E)**

Médico informante: Fecha

El DNA mitocondrial (mtDNA) es el material genético localizado en el interior de las mitocondrias. Estos genes son exclusivamente heredados por vía materna. El mtDNA incluye 37 genes cuya expresión es necesaria para una producción eficiente de energía en la célula. Además, otros procesos celulares son dependientes del correcto funcionamiento de las proteínas codificadas por dichos genes. Entre los seres humanos se pueden encontrar diferencias en estos genes.

Se pretende estudiar cómo las variantes genéticas mitocondriales pueden influir en el desarrollo de la Degeneración Macular Asociada a la Edad.

Para ello, los pacientes seleccionados deberán donar de manera voluntaria una muestra de sangre con la que se realizarán análisis genéticos en el ambiente controlado del laboratorio.

Confidencialidad

La participación y los resultados del estudio serán absolutamente confidenciales. Se garantiza el anonimato de los participantes mediante la utilización de un código personal para cada muestra.

Sólo el equipo investigador tendrá acceso a esta información, aunque se podrá publicar sin la identificación de los pacientes.

Declaraciones y firma

Yo,, con DNI

Declaro que he sido informado del propósito del estudio y he tenido la posibilidad de hacer preguntas para su correcta comprensión.

Entiendo que mi participación es voluntaria y no remunerada, y sé que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento.

Se me ha informado que tengo derecho a decidir si quiero saber o no el resultado de las pruebas en el caso de que haya algún dato relevante.

En consecuencia doy mi consentimiento

Firma del paciente

Firma del médico

Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa"
Servicio de Oftalmología
Zaragoza

Datos del paciente:

Apellidos

Nombre

Sexo Fecha de nacimiento

Afiliación Nº Historia

Domicilio

Población Teléfonos

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA UTILIZACIÓN DE DATOS DE LA HISTORIA CLÍNICA EN EL ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (D.M.A.E)

Médico informante: Fecha

La Degeneración Macular Asociada a la edad se considera la principal causa de ceguera en los países desarrollados en personas de más de 60 años de edad. Existe un tratamiento efectivo que consiste en la administración de fármacos anti-VEGF que ha conseguido mejorar la evolución de la enfermedad disminuyendo la tasa de ceguera legal. Sin embargo, la respuesta al tratamiento de los pacientes no es homogénea y se buscan factores que puedan estar implicados en la misma.

Se pretenden estudiar las características clínicas y demográficas de los pacientes afectos con esta enfermedad y que son tratados en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Para ello, los pacientes seleccionados y que voluntariamente dan su consentimiento para la realización del estudio, permitirán el acceso a sus datos de historia clínica hospitalaria por parte de los investigadores del estudio.

Confidencialidad

La participación y los resultados del estudio serán absolutamente confidenciales. Se garantiza el anonimato de los participantes.

Sólo el equipo investigador tendrá acceso a esta información, aunque se podrá publicar sin la identificación de los pacientes.

Declaraciones y firma

Yo,, con DNI

Declaro que he sido informado del propósito del estudio y he tenido la posibilidad de hacer preguntas para su correcta comprensión.

Entiendo que mi participación es voluntaria y no remunerada, y sé que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento.

Se me ha informado que tengo derecho a decidir si quiero saber o no el resultado de las pruebas en el caso de que haya algún dato relevante.

En consecuencia doy mi consentimiento

Firma del paciente

Firma del médico

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA:

1. Effect of mitochondrial haplogroups on ranibizumab response in neovascular age-related macular degeneration patients: a pilot study.
Esteban O, Ascaso FJ, Mateo J, Calvo T, Montoya J, Ruiz-Pesini E.
Acta Ophthalmol. 2018 Sep 10. doi: 10.1111/aos.13865.
2. Influencia del haplogrupo del DNA mitocondrial en la respuesta al tratamiento con ranibizumab en pacientes con degeneración macular asociada a la edad avanzada nevoascular.
Admitido para su presentación en XXIII congreso de la Sociedad Española de Retina y Vitreo (Madrid, 8 y 9 de marzo de 2019).
3. Association between mitochondrial haplogroups and ranibizumab response in neovascular age-related macular degeneration.
Admitido para su presentación en Annual Meeting The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (28 Abril-2 Mayo en Vancouver).





BIBLIOGRAFÍA



9. BIBLIOGRAFÍA

1. de Jong PTVM. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006;355:1474-85.
2. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2018;392:1147-59.
3. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2:e106-116.
4. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012;379:1728-38.
5. Rosenfeld PJ, Shapiro H, Tuomi L, Webster M, Elledge J, Blodi B, et al. Characteristics of patients losing vision after 2 years of monthly dosing in the phase III ranibizumab clinical trials. *Ophthalmology*. 2011;118:523-30.
6. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2:e106-116.
7. Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, Alves D, Cachulo ML, Khawaja AP, et al. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology*. 2017;124:1753-63.
8. Jonas JB, Cheung CMG, Panda-Jonas S. Updates on the Epidemiology of Age-Related Macular Degeneration. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2017;6:493-7.
9. Spanish Eyes Epidemiological (SEE) Study Group. Prevalence of age-related macular degeneration in Spain. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:931-6.
10. Andonegui J, Serrano L, Eguzkiza A. [eOphthalmology: current state and future tendencies]. *An Sist Sanit Navar*. 2010;33:79-91.
11. Kanagasingam Y, Bhuiyan A, Abramoff MD, Smith RT, Goldschmidt L, Wong TY. Progress on retinal image analysis for age related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2014;38:20-42.
12. Gass JD. Biomicroscopic and histopathologic considerations regarding the feasibility of surgical excision of subfoveal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol*. 1994;118:285-98.
13. Freund KB, Zweifel SA, Engelbert M. Do we need a new classification for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration? *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2010;30:1333-49.
14. Ardeljan D, Chan C-C. Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Prog Retin Eye Res*. 2013;37:68-89.
15. Campa C, Costagliola C, Incorvaia C, Sheridan C, Semeraro F, De Nadai K, et al. Inflammatory mediators and angiogenic factors in choroidal neovascularization: pathogenetic interactions and therapeutic implications. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.
16. Jaffe GJ, Ying G-S, Toth CA, Daniel E, Grunwald JE, Martin DF, et al. Macular Morphology and Visual Acuity in Year Five of the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology*. 2018;
17. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Feinsod M, Guyer DR, VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004;351:2805-16.

18. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012;15:171-85.
19. Kovach JL, Schwartz SG, Flynn HW, Scott IU. Anti-VEGF Treatment Strategies for Wet AMD. *J Ophthalmol*. 2012;2012:786870.
20. 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;355:1419-31.
21. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T, et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009;116:57-65.e5.
22. Schmidt-Erfurth U, Eldem B, Guymer R, Korobelnik J-F, 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;118:831-9.
23. 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.e1.
24. 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;118:663-71.
25. CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Ying G, Grunwald JE, Fine SL, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2011;364:1897-908.
26. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying G, Jaffe GJ, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology*. 2012;119:1388-98.
27. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, Culliford LA, et al. Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. *Lancet*. 2013;382:1258-67.
28. IVAN Study Investigators, Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology*. 2012;119:1399-411.
29. Busbee BG, Ho AC, Brown DM, Heier JS, Suñer IJ, Li Z, et al. Twelve-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013;120:1046-56.
30. García-Layana A, Cabrera-López F, García-Arumí J, Arias-Barquet L, Ruiz-Moreno JM. Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. *Clin Interv Aging*. 2017;12:1579-87.
31. Buch H, Vinding T, la Cour M, Jensen GB, Prause JU, Nielsen NV. Risk factors for age-related maculopathy in a 14-year follow-up study: the Copenhagen City Eye Study. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005;83:409-18.
32. Owen CG, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher AE, Rudnicka AR. The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK. *Br J Ophthalmol*. 2012;96:752-6.
33. Al-Zamil WM, Yassin SA. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging*. 2017;12:1313-30.
34. Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio CA, Swaroop A. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics*

- Hum Genet. 2014;15:151-71.
35. Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, Sobrin L, Parker M, Raychaudhuri S, et al. Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:7395-400.
 36. Yang Z, Stratton C, Francis PJ, Kleinman ME, Tan PL, Gibbs D, et al. Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2008;359:1456-63.
 37. Fritsche LG, Igl W, Bailey JNC, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet*. 2016;48:134-43.
 38. Smailhodzic D, Muether PS, Chen J, Kwestro A, Zhang AY, Omar A, et al. Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2012;119:2304-11.
 39. Medina FMC, Alves Lopes da Motta A, Takahashi WY, Carricondo PC, Dos Santos Motta MM, Melo MB, et al. Pharmacogenetic Effect of Complement Factor H Gene Polymorphism in Response to the Initial Intravitreal Injection of Bevacizumab for Wet Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Res*. 2015;54:169-74.
 40. Jones MM. Mitochondrial DNA Haplogroups and Age-Related Maculopathy. *Archives of Ophthalmology*. 2007;125:1235.
 41. Canter JA, Olson LM, Spencer K, Schnetz-Boutaud N, Anderson B, Hauser MA, et al. Mitochondrial DNA Polymorphism A4917G Is Independently Associated with Age-Related Macular Degeneration. Nicholas Weedon M, editor. *PLoS ONE*. 2008;3:e2091.
 42. Udar N, Atilano SR, Memarzadeh M, Boyer DS, Chwa M, Lu S, et al. Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50:2966-2974.
 43. Mueller EE, Schaijer E, Brunner SM, Eder W, Mayr JA, Egger SF, et al. Mitochondrial Haplogroups and Control Region Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration: A Case-Control Study. Apte RS, editor. *PLoS ONE*. 2012;7:e30874.
 44. Kenney MC, Hertzog D, Chak G, Atilano SR, Khatibi N, Soe K, et al. Mitochondrial DNA haplogroups confer differences in risk for age-related macular degeneration: a case control study. *BMC medical genetics*. 2013;14:4.
 45. Bellezza I. Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Nrf2 as Therapeutic Target. *Front Pharmacol*. 2018;9:1280.
 46. Fisher CR, Ferrington DA. Perspective on AMD Pathobiology: A Bioenergetic Crisis in the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59:AMD41-7.
 47. Nordgaard CL, Karunadharm PP, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA. Mitochondrial proteomics of the retinal pigment epithelium at progressive stages of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:2848-55.
 48. Sreekumar PG, Kannan R, de Silva AT, Burton R, Ryan SJ, Hinton DR. Thiol regulation of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;346:1200-6.
 49. 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;12:1649-59.
 50. Sayanagi K, Sharma S, Kaiser PK. Photoreceptor status after antivasular endothelial growth factor therapy in exudative age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:622-6.
 51. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum Mol Genet*. 2014;23:3537-51.

52. Blasiak J, Glowacki S, Kauppinen A, Kaarniranta K. Mitochondrial and Nuclear DNA Damage and Repair in Age-Related Macular Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14:2996-3010.
53. Lin H, Xu H, Liang F-Q, Liang H, Gupta P, Havey AN, et al. Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:3521-9.
54. Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct*. 2012;2012:646354.
55. 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;355:1432-44.
56. Giacomelli G, Giansanti F, Finocchio L, Biagini I, Bacherini D, Virgili G, et al. Results of intravitreal ranibizumab with a prn regimen in the treatment of extrafoveal and juxtafoveal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2014;34:860-7.
57. Subramanian ML, Abedi G, Ness S, Ahmed E, Fenberg M, Daly MK, et al. Bevacizumab vs ranibizumab for age-related macular degeneration: 1-year outcomes of a prospective, double-masked randomised clinical trial. *Eye (Lond)*. 2010;24:1708-15.
58. Williams PD, Callanan D, Solley W, Avery RL, Pieramici DJ, Aaberg T. A prospective pilot study comparing combined intravitreal ranibizumab and half-fluence photodynamic therapy with ranibizumab monotherapy in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:1519-25.
59. 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 (Philadelphia, Pa)*. 2011;31:1261-7.
60. García-Layana A, Figueroa MS, Arias L, Araiz J, Ruiz-Moreno JM, García-Arumí J, et al. Individualized Therapy with Ranibizumab in Wet Age-Related Macular Degeneration. *J Ophthalmol*. 2015;2015:412903.
61. Krebs I, Glittenberg C, Ansari-Shahrezaei S, Hagen S, Steiner I, Binder S. Non-responders to treatment with antagonists of vascular endothelial growth factor in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2013;97:1443-6.
62. Boyer DS, Antoszyk AN, Awh CC, Bhisitkul RB, Shapiro H, Acharya NR, et al. Subgroup analysis of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2007;114:246-52.
63. Cohen SY, Dubois L, Tadayoni R, Fajnkuchen F, Nghiem-Buffer S, Delahaye-Mazza C, et al. Results of one-year's treatment with ranibizumab for exudative age-related macular degeneration in a clinical setting. *Am J Ophthalmol*. 2009;148:409-13.
64. Hykin P, Chakravarthy U, Lotery A, McKibbin M, Napier J, Sivaprasad S. A retrospective study of the real-life utilization and effectiveness of ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration in the UK. *Clin Ophthalmol*. 2016;10:87-96.
65. Droege KM, Muether PS, Hermann MM, Caramoy A, Viebahn U, Kirchhof B, et al. Adherence to ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration in real life. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251:1281-4.
66. Muether PS, Hoerster R, Hermann MM, Kirchhof B, Fauser S. Long-term effects of ranibizumab treatment delay in neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251:453-8.
67. Berg K, Pedersen TR, Sandvik L, Bragadóttir R. Comparison of ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration according to LUCAS treat-and-extend protocol. *Ophthalmology*. 2015;122:146-52.
68. Krebs I, Schmetterer L, Boltz A, Told R, Vécsei-Marlovits V, Egger S, et al. A randomised double-masked trial comparing the visual outcome after treatment with

- ranibizumab or bevacizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2013;97:266-71.
69. Rothenbuehler SP, Waeber D, Brinkmann CK, Wolf S, Wolf-Schnurrbusch UEK. Effects of ranibizumab in patients with subfoveal choroidal neovascularization attributable to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2009;147:831-7.
70. 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;143:566-83.
71. Gianniou C, Dirani A, Ferrini W, Marchionno L, Decugis D, Deli A, et al. Two-year outcome of an observe-and-plan regimen for neovascular age-related macular degeneration: how to alleviate the clinical burden with maintained functional results. *Eye (Lond).* 2015;29:342-9.
72. Mantel I, Deli A, Iglesias K, Ambresin A. Prospective study evaluating the predictability of need for retreatment with intravitreal ranibizumab for age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013;251:697-704.
73. Chakravarthy U, Williams M, AMD Guidelines Group. The Royal College of Ophthalmologists Guidelines on AMD: Executive Summary. *Eye (Lond).* 2013;27:1429-31.
74. Amoaku WM, Chakravarthy U, Gale R, Gavin M, Ghanchi F, Gibson J, et al. Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD. *Eye.* 2015;29:721-731.
75. Suzuki M, Nagai N, Izumi-Nagai K, Shinoda H, Koto T, Uchida A, et al. Predictive factors for non-response to intravitreal ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2014;98:1186-91.
76. 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;154:125-36.
77. Krüger Falk M, Kemp H, Sørensen TL. Four-year treatment results of neovascular age-related macular degeneration with ranibizumab and causes for discontinuation of treatment. *Am J Ophthalmol.* 2013;155:89-95.e3.
78. Akiyama M, Takahashi A, Momozawa Y, Arakawa S, Miya F, Tsunoda T, et al. Genome-wide association study suggests four variants influencing outcomes with ranibizumab therapy in exudative age-related macular degeneration. *J Hum Genet.* 2018;
79. Amoaku WM, Chakravarthy U, Gale R, Gavin M, Ghanchi F, Gibson J, et al. Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD. *Eye (Lond).* 2015;29:721-31.
80. 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;145:239-48.
81. Iacono P, Battaglia Parodi M, Bandello F. Non-Responders to Intravitreal Ranibizumab in Subfoveal Choroidal Neovascularization Secondary to Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Res.* 2017;57:42-7.
82. Heier JS, Antoszyk AN, Pavan PR, Leff SR, Rosenfeld PJ, Ciulla TA, et al. Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a phase I/II multicenter, controlled, multidose study. *Ophthalmology.* 2006;113:633.e1-4.
83. Jonas JB, Libondi T, Ihloff AK, Harder B, Kreissig I, Schlichtenbrede F, et al. Visual acuity change after intravitreal bevacizumab for exudative age-related macular degeneration in relation to subfoveal membrane type. *Acta Ophthalmol Scand.* 2007;85:563-5.
84. 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 (Philadelphia, Pa).* 2010;30:1368-75.
85. Engelbert M, Zweifel SA, Freund KB. «Treat and extend» dosing of intravitreal

antivascular endothelial growth factor therapy for type 3 neovascularization/retinal angiomatous proliferation. *Retina* (Philadelphia, Pa). 2009;29:1424-31.

86. Mrejen S, Jung JJ, Chen C, Patel SN, Gallego-Pinazo R, Yannuzzi N, et al. Long-Term Visual Outcomes for a Treat and Extend Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Regimen in Eyes with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *J Clin Med*. 2015;4:1380-402.

87. Daniel E, Shaffer J, Ying G, Grunwald JE, Martin DF, Jaffe GJ, et al. Outcomes in Eyes with Retinal Angiomatous Proliferation in the Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology*. 2016;123:609-16.

88. Andreoli MT, Morrison MA, Kim BJ, Chen L, Adams SM, Miller JW, et al. Comprehensive analysis of complement factor H and LOC387715/ARMS2/HTRA1 variants with respect to phenotype in advanced age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2009;148:869-74.

89. Leveziel N, Puche N, Richard F, Somner JEA, Zerbib J, Bastuji-Garin S, et al. Genotypic influences on severity of exudative age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:2620-5.

90. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*. 2005;8:299-309.

91. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang W-T, Duda DG, Cohen KS, et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*. 2007;11:83-95.

92. Ellis LM, Hicklin DJ. Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6371-5.

93. Piermarocchi S, Miotto S, Colavito D, Leon A, Segato T. Combined effects of genetic and non-genetic risk factors affect response to ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2015;93:e451-457.

94. Cobos E, Recalde S, Anter J, Hernandez-Sanchez M, Barreales C, Olavarrieta L, et al. Association between CFH, CFB, ARMS2, SERPINF1, VEGFR1 and VEGF polymorphisms and anatomical and functional response to ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2018;96:e201-12.

95. Dahmany Y, Marcuello A, Montiel-Soxa FJ, Montoya J, Díez-Sánchez C, Lopez-Perez MJ, et al. Mitochondrial lineages distribution in the Spanish population: anticipating association studies. En: ANALES-REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. Citeseer; 2006. p. 37.

96. Hernández CL, Dugoujon JM, Novelletto A, Rodríguez JN, Cuesta P, Calderón R. The distribution of mitochondrial DNA haplogroup H in southern Iberia indicates ancient human genetic exchanges along the western edge of the Mediterranean. *BMC Genet*. 2017;18:46.

97. Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, et al. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet*. 2000;67:1251-76.

98. Esteban O, Ascaso FJ, Mateo J, Calvo T, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Effect of mitochondrial haplogroups on ranibizumab response in neovascular age-related macular degeneration patients: a pilot study. *Acta Ophthalmol*. 2018;

99. Gerding H. Ranibizumab treatment in age-related macular degeneration: a meta-analysis of one-year results. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2014;231:427-31.

100. Dirani A, Mantel I. Ranibizumab treatment history as predictor of the switch-response to aflibercept: evidence for drug tolerance. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:593-600.

101. Bai Y, Zhu X, Chao J, Zhang Y, Qian C, Li P, et al. Pericytes contribute to the disruption of the cerebral endothelial barrier via increasing VEGF expression: implications for stroke. *PLoS ONE*. 2015;10:e0124362.

102. Satake S, Kuzuya M, Miura H, Asai T, Ramos MA, Muraguchi M, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor in response to glucose deprivation. *Biol Cell*.

1998;90:161-8.

103. Carrière A, Ebrahimian TG, Dehez S, Augé N, Joffre C, André M, et al. Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1093-9.

104. Barcia C, Bautista V, Sánchez-Bahillo A, Fernández-Villalba E, Fauchoux B, Poza y Poza M, et al. Changes in vascularization in substantia nigra pars compacta of monkeys rendered parkinsonian. *J Neural Transm (Vienna).* 2005;112:1237-48.

105. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Mourad JJ, Plouin PF, Corvol P, et al. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am J Hum Genet.* 2001;69:1186-97.

106. Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Kerlan V, Plouin P-F, et al. Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4771-4.

107. Chang J, Jung HJ, Jeong SH, Kim HK, Han J, Kwon HJ. A mutation in the mitochondrial protein UQCRB promotes angiogenesis through the generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;455:290-7.

108. Cheon H, Moon H-E, Lee M-S, Kim SS. Loss of mitochondrial DNA enhances angiogenic and invasive potential of hepatoma cells. *Oncology reports.* 2010;23:779-786.

109. Ishikawa K, Koshikawa N, Takenaga K, Nakada K, Hayashi J-I. Reversible regulation of metastasis by ROS-generating mtDNA mutations. *Mitochondrion.* 2008;8:339-44.

110. Koshikawa N, Hayashi J-I, Nakagawara A, Takenaga K. Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J Biol Chem.* 2009;284:33185-94.

111. Koshikawa N, Akimoto M, Hayashi J-I, Nagase H, Takenaga K. Association of predicted pathogenic mutations in mitochondrial ND genes with distant metastasis in NSCLC and colon cancer. *Scientific Reports [Internet].* 2017 [citado 16 de diciembre de 2017];7. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-15592-2>

112. Taivassalo T, Ayyad K, Haller RG. Increased capillaries in mitochondrial myopathy: implications for the regulation of oxygen delivery. *Brain.* 2012;135:53-61.

113. Lake NJ, Bird MJ, Isohanni P, Paetau A. Leigh syndrome: neuropathology and pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74:482-92.

114. Ruiz-Pesini E, Emperador S, López-Gallardo E, Hernández-Ainsa C, Montoya J. Increasing mtDNA levels as therapy for mitochondrial optic neuropathies. *Drug Discov Today.* 2018;23:493-8.

115. Cascavilla ML, Parisi V, Triolo G, Ziccardi L, Borrelli E, Di Renzo A, et al. Retinal dysfunction characterizes subtypes of dominant optic atrophy. *Acta Ophthalmol.* 2018;96:e156-63.

116. Pershadsingh HA, Moore DM. PPARgamma Agonists: Potential as Therapeutics for Neovascular Retinopathies. *PPAR Res.* 2008;2008:164273.

117. Sulaiman RS, Basavarajappa HD, Corson TW. Natural product inhibitors of ocular angiogenesis. *Exp Eye Res.* 2014;129:161-71.

118. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-60.

119. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:273-86.

120. Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:1-29.

121. Paulus YM, Sodhi A. Anti-angiogenic Therapy for Retinal Disease. *Handb Exp*

- Pharmacol. 2017;242:271-307.
122. Marrelli A, Cipriani P, Liakouli V, Carubbi F, Perricone C, Perricone R, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation? *Autoimmun Rev.* 2011;10:595-8.
 123. Tas SW, Maracle CX, Balogh E, Szekanecz Z. Targeting of proangiogenic signalling pathways in chronic inflammation. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12:111-22.
 124. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407:249-57.
 125. Kent DL. Age-related macular degeneration: beyond anti-angiogenesis. *Mol Vis.* 2014;20:46-55.
 126. Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog EM. Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8:153-62.
 127. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4:891-9.
 128. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3:187-97.
 129. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell.* 2007;11:407-20.
 130. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:705-13.
 131. Wallace DC. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J Clin Invest.* 2013;123:1405-12.
 132. Hu J, Bianchi F, Ferguson M, Cesario A, Margaritora S, Granone P, et al. Gene expression signature for angiogenic and nonangiogenic non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2005;24:1212-9.
 133. Donnem T, Reynolds AR, Kuczynski EA, Gatter K, Vermeulen PB, Kerbel RS, et al. Non-angiogenic tumours and their influence on cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 2018;18:323-36.
 134. Feher J, Kovacs I, Artico M, Cavallotti C, Papale A, Gabrieli CB. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiology of aging.* 2006;27:983-993.
 135. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, et al. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet.* 2010;19:3343-53.
 136. Estopinal CB, Chocron IM, Parks MB, Wade EA, Roberson RM, Burgess LG, et al. Mitochondrial haplogroups are associated with severity of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:5589-95.
 137. Martikainen MH, Rönnemaa T, Majamaa K. Association of mitochondrial DNA haplogroups and vascular complications of diabetes mellitus: A population-based study. *Diab Vasc Dis Res.* 2015;12:302-4.
 138. Sheu S-J, Chao Y-M, Liu N-C, Chan JYH. Differential effects of bevacizumab, ranibizumab and aflibercept on cell viability, phagocytosis and mitochondrial bioenergetics of retinal pigment epithelial cell. *Acta Ophthalmologica.* 2015;93:e631-43.
 139. Navarro P, Bueno MJ, Zagorac I, Mondejar T, Sanchez J, Mourón S, et al. Targeting Tumor Mitochondrial Metabolism Overcomes Resistance to Antiangiogenics. *Cell Rep.* 2016;15:2705-18.
 140. Chen Y, Li X-X, Xing N-Z, Cao X-G. Quercetin inhibits choroidal and retinal angiogenesis in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246:373-8.
 141. Li F, Bai Y, Zhao M, Huang L, Li S, Li X, et al. Quercetin inhibits vascular endothelial

growth factor-induced choroidal and retinal angiogenesis in vitro. *Ophthalmic Res.* 2015;53:109-16.

142. Zhuang P, Shen Y, Lin BQ, Zhang WY, Chiou GCY. Effect of quercetin on formation of choroidal neovascularization (CNV) in age-related macular degeneration (AMD). *Eye Sci.* 2011;26:23-9.

