

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA**

**SAN VICENTE MÁRTIR**



Cambios en la ultraestructura de la retina externa en pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) exudativa tratados con aflibercept. Estudio piloto de exosomas circulantes en plasma de sujetos sanos y pacientes con DMAE exudativa.

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

Verónica Castro Navarro

Dirigida por:

Dr. D. Francisco Javier Romero Gómez

Dr. D. Enrique Cervera Taulet

2017



*Dedicado a Alfonso, Susana y Rafa*



# Agradecimientos

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Enrique Cervera Taulet por toda su ayuda, su apoyo y su confianza, y por continuar transmitiéndome sus amplios conocimientos clínicos y quirúrgicos permitiéndome, día a día, un gran crecimiento profesional y personal; y al Dr. Francisco Javier Romero Gómez, por su orientación, estímulo y tiempo dedicado.

A Cati y a Javi por todo lo que me han enseñado, por compartir conmigo su ilusión y su pasión por la oftalmología, por su esfuerzo y por su ánimo pero, sobre todo, por su amistad; a Marisa Hernández por constituir un referente para mí desde que me inicié en el mundo oftalmológico y a quien me gustaría parecerme en el terreno profesional y personal. A mis residentes mayores y pequeños: Alicia, Nuria, Laura, Carlos, Cecilia, Lucía y Clara y al resto de médicos integrantes del servicio de oftalmología del Hospital General de Valencia: José Pinós, Paula Palomares, Ricardo Campos, Luis Olcina, Ana Cabrera, Baltasar Moratal, Clara Torralba, Carolina García y Rafael Freiría porque gracias a su dedicación y confianza he aprendido a ser mejor profesional y persona. A Laura Caracena, Alexa y a toda enfermería y auxiliares de la policlínica y del quirófano del Hospital General por la ayuda prestada, su dedicación y, en general, por todo su apoyo.

A Lorena Vidal por descubrirme el mundo del laboratorio, por todo su trabajo y esfuerzo. Sin ella y sin los recursos prestados por la Universidad Católica de Valencia la parte experimental de esta tesis hubiera sido imposible.

A Ramón, mi amigo y compañero de doctorado y a Vane por haber estado ahí en los momentos buenos y en los malos y porque sigamos compartiendo juntos más experiencias.

A Andrea y Marina por quererme y apoyarme, aún en la distancia, sé que nunca me fallaréis. Gracias por todo flowers.

---

A mi abuela y a mis padres, Alfonso y Susana, por todo su amor, por haberme hecho quien soy y enseñarme los valores más importante de mi vida, por apoyarme en todo momento y porque no me podría sentir más orgullosa de nadie en este mundo.

A Rafa mi compañero, mi amigo y la persona que se ha esforzado y trabajado por hacerse a mi igual que yo a él. Por ayudarme en el desarrollo de la tesis y proporcionarme el soporte gráfico, informático y estadístico. Por quererme y hacerme reir y por aguanterme en los momentos malos cuando ni yo misma me aguantaba. Sin tu ayuda y sin tu apoyo nada de esto habría sido posible.

# Índice general

1	Introducción	1
1.1	Aspectos fundamentales de la anatomía retino - coroidea	1
1.1.1	Retina neurosensorial	2
1.1.2	Epitelio pigmentario de la retina	9
1.1.3	Circulación retiniana	11
1.1.4	Coroides: Membrana de Bruch y capa vascular	12
1.1.5	Anatomía específica de la mácula	14
1.2	Exosomas	15
1.2.1	Proceso de formación de los exosomas y composición de los mismos	16
1.2.2	Clasificación y aislamiento	19
1.2.3	Funciones e implicaciones fisiológicas y patológicas	20
1.2.4	Papel de los exosomas en la degeneración macular asociada a la edad	22
1.2.5	Aplicaciones diagnósticas y terapéuticas	26
1.3	Abordaje diagnóstico de las enfermedades de la retina	28
1.3.1	Mejor agudeza visual corregida	29
1.3.2	Retinografía	33
1.3.3	Tomografía de coherencia óptica	38
1.3.4	Angiografía con fluoresceína	44
1.3.5	Angiografía con verde de indocianina	47
1.3.6	Autofluorescencia	49
1.3.7	Tomografía de coherencia óptica con angiografía	52
1.4	La degeneración macular asociada a la edad	53
1.4.1	Concepto	53
1.4.2	Clasificación	54

1.4.3 Epidemiología . . . . .	57
1.4.4 Patogénesis y factores de riesgo. . . . .	61
1.4.5 Síntomas y signos clínicos . . . . .	65
1.4.6 Diagnóstico . . . . .	87
1.5 El tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad exudativa . . . . .	94
1.5.1 Fármacos anti - factor de crecimiento del endotelio vascular . . . . .	95
1.5.2 Afibercept . . . . .	97
1.5.3 Regímenes de tratamiento . . . . .	107
2 Hipótesis y objetivos . . . . .	109
2.1 Hipótesis . . . . .	109
2.2 Objetivos . . . . .	110
3 Material y métodos . . . . .	111
3.1 Estudio clínico. . . . .	111
3.1.1 Diseño del estudio . . . . .	111
3.1.2 Materiales y recursos utilizados . . . . .	111
3.1.3 Muestra y selección de pacientes . . . . .	113
3.1.4 Protocolo de exploración y parámetros de estudio . . . . .	114
3.1.5 Administración de medicación intravítrea. . . . .	118
3.1.6 Recogida de datos . . . . .	119
3.1.7 Análisis estadísticos . . . . .	119
3.2 Estudio experimental . . . . .	122
3.2.1 Diseño del estudio . . . . .	122
3.2.2 Materiales . . . . .	122
3.2.3 Materiales y recursos utilizados . . . . .	122
3.2.4 Selección de pacientes. . . . .	124
3.2.5 Protocolo de exploración y parámetros de estudio . . . . .	126
3.2.6 Obtención y tratamiento de las muestras . . . . .	127
3.2.7 Recogida de datos . . . . .	129
3.2.8 Análisis estadísticos . . . . .	129

4 Resultados	131
4.1 Resultados: Estudio clínico	131
4.1.1 Análisis descriptivo	132
4.1.2 Análisis estadístico	136
4.2 Resultados: Estudio experimental	149
4.2.1 Análisis descriptivo	150
5 Discusión	153
5.1 Estudio clínico	153
5.1.1 Factores demográficos y efectividad del régimen tratar y extender con aflibercept	153
5.1.2 Resultados anatómicos y funcionales según el subtipo neovascular	161
5.1.3 Implicaciones pronósticas y terapéuticas de los subtipos neovasculares	171
5.1.4 Factores pronósticos de agudeza visual	175
5.1.5 Grosor coroideo	177
5.2 Estudio experimental	179
5.2.1 Análisis cuantitativo de exosomas circulantes en plasma	179
6 Conclusiones	185
6.1 Conclusiones	185
Apéndices	187
A Informe del comité ético de investigación clínica I	189
B Informe del comité ético de investigación clínica II	193
Bibliografía	197



# Índice de figuras

1.1. Capas y células de la retina. . . . .	3
1.2. Partes de los fotorreceptores. . . . .	5
1.3. Interacción entre conos foveales, conos perifoveales y bastones con el EPR. . . . .	6
1.4. Funciones del EPR. . . . .	11
1.5. Exosoma. . . . .	16
1.6. Mecanismos de comunicación celular en los exosomas. . . . .	21
1.7. Optotipo tipo cuadro Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS). . . . .	31
1.8. Retinografía color. . . . .	35
1.9. Retinografía color con filtros y multicolor. . . . .	37
1.10. Imágenes de OCT de tipo Fourier centrados en fóvea. . . . .	41
1.11. Líneas hiperreflectivas de retina externa en SD - OCT. . . . .	43
1.12. Imagen de AGF de una NVC tipo 2 secundaria a DMAE. . . . .	46
1.13. Imagen de AVI de láser de barrido confocal en fase media en una VCP. . . . .	50
1.14. Patrones de atrofia inicial del EPR en AF. . . . .	52
1.15. Imagen del área macular con SS - angio - OCT. . . . .	53
1.16. Factores de riesgo para el desarrollo de DMAE avanzada. . . . .	56
1.17. Personas mayores de 64 años en España. . . . .	60
1.18. Patogenia en la DMAE. . . . .	64

1.19. Patogenia de la neovascularización en la DMAE. . . . .	65
1.20. Pseudodrusas reticulares. . . . .	68
1.21. Imagen de OCT de corrugación de la retina externa. . . . .	70
1.22. Ruptura del EPR. . . . .	73
1.23. Progresión de atrofia del EPR. . . . .	76
1.24. Membrana neovascular tipo 1. . . . .	79
1.25. Membrana neovascular tipo 2. . . . .	81
1.26. Membrana neovascular tipo 3 o RAP. . . . .	83
1.27. Membrana neovascular tipo VCP. . . . .	85
1.28. Cicatriz disciforme. . . . .	87
1.29. Aflibercept. . . . .	98
1.30. Mecanismo de unión al VEGF de aflibercept. . . . .	98
1.31. Protocolo de tratamiento de estudios VIEW. . . . .	102
1.32. Principales resultados de estudios VIEW. . . . .	102
3.1. Aislamiento de exosomas. . . . .	128
3.2. Desechamiento del sobrenadante con pellet de exosomas. . . . .	128
4.1. Distribución de los subtipos neovasculares. . . . .	133
4.2. Localización de los subtipos neovasculares. . . . .	134
4.3. Agudeza visual. . . . .	136
4.4. Agudeza visual según subtipos neovasculares. . . . .	137
4.5. Grosor macular. . . . .	140
4.6. GMC según el subtipo neovascular. . . . .	140
4.7. VM según el subtipo neovascular. . . . .	141

4.8. Presencia de LSR. . . . .	141
4.9. Presencia de LSR y FIR según el subtipo neovascular. . . . .	142
4.10. Presencia de FIR. . . . .	142
4.11. Altura máxima del DEP según el subtipo neovascular. . . . .	144
4.12. Longitud de la membrana limitante externa según el subtipo neovascular . . . .	146
4.13. Longitud de la capa de los elipsoides según el subtipo neovascular. . . . .	146
4.14. Grosor coroideo . . . . .	147
4.15. Número de exosomas / mL. . . . .	150
4.16. Número de exosomas / mL en cada paciente. . . . .	151
4.17. Porcentaje de exosomas / mL. . . . .	152
4.18. Porcentaje de exosomas CD9RPE65 / mL en cada paciente. . . . .	152
5.1. Cambios en los principales parámetros según el subtipo neovascular. . . . .	163



# Índice de tablas

1.1. Clasificación internacional de la DMAE. . . . .	55
1.2. Clasificación de la DMAE desarrollada por Ferris y colaboradores en 2013. . . . .	57
1.3. Principales estudios epidemiológicos en la DMAE. . . . .	58
1.4. Factores genéticos en la DMAE. . . . .	61
1.5. Clasificación de las drusas. . . . .	68
1.6. Tipos de DEP. . . . .	71
4.1. Edad, sexo y ojo afectado. . . . .	132
4.2. Comorbilidades según el subtipo neovascular. . . . .	133
4.3. Afectación bilateral en los subtipos neovasculares. . . . .	135
4.4. Número de inyecciones y visitas según el subtipo neovascular. . . . .	135
4.5. Ganancia de agudeza visual en líneas ETDRS. . . . .	137
4.6. Hallazgos en retinografía. . . . .	138
4.7. Hallazgos en retinografía según el subtipo neovascular. . . . .	138
4.8. Presencia de DEP. . . . .	143
4.9. Presencia de DEP según la localización y el subtipo neovascular. . . . .	144
4.10. Longitud de la membrana limitante externa y de la capa de los elipsoides. . . . .	145
4.11. Grosor coroideo según el subtipo neovascular. . . . .	147

4.12. Cambios estadísticos del grosor coroideo según el subtipo neovascular. . . . .	148
4.13. Correlación entre los distintos factores y la agudeza visual. . . . .	149

# Índice de abreviaturas

- **ADN**, Ácido desoxirribonucleico
- **GABA**, Ácido gamma-aminobutírico
- **AREDS**, Age - related- eye disease study
- **AV**, Agudeza visual
- **AGF**, Angiografía con fluoresceína/ fluoresceínica
- **AVI**, Angiografía con verde de indocianina
- **SSADA**, Angio - OCT con decorrelación de la amplitud de espectro dividido
- **SS - angio - OCT**, Angio - OCT Swept Source
- **ARN**, Ácido ribonucleico
- **mARN**, ARN mensajero
- **AG**, Atrofia geográfica
- **AF**, Autofluorescencia
- **CEP**, Carboxietilpirrol
- **ESCRT**, Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte
- **COST**, Cone outer segment tip
- **DMAE**, Degeneración macular asociada a la edad
- **DEP**, Desprendimiento del epitelio pigmentario
- **ETDRS**, Early treatment diabetic retinopathy study

- **EPR**, Epitelio pigmentario de la retina
- **CFB**, Factor B del complemento
- **VEGF**, Factor de crecimiento del endotelio vascular
- **PIGF**, Factor de crecimiento placentario
- **CFH**, Factor H del complemento
- **HIF - 1**, Factor inducible de hipoxia
- **FIR**, Fluido intrarretiniano
- **GMC**, Grosor macular central
- **HTA**, Hipertensión arterial
- **HGUV**, Hospital General y Universitario de Valencia
- **LIR**, Líquido intrarretiniano
- **LSR**, Líquido subretiniano
- **logMAR**, Logaritmo del mínimo ángulo de resolución
- **MPS**, Macular photocoagulation study
- **MAE**, Maculopatía asociada a la edad
- **MLE**, Membrana limitante externa
- **miARN**, MicroARN
- **NVC**, Neovascularización coroidea
- **OMAG**, OCT microangiografía
- **AGES**, Productos finales de glicosilación
- **RAP**, Proliferación angiomasosa retiniana
- **PRN**, Pro re nata
- **VEGFR**, Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
- **SE**, Segmentos externos

- **SI**, Segmentos internos
- **OCT**, Tomografía de coherencia óptica
- **Angio - OCT**, Tomografía de coherencia óptica con angiografía
- **OCT - EDI**, Tomografía de coherencia óptica con tecnología tipo Enhanced Deep Image
- **SD - OCT**, Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral
- **T - OCT**, Tomografía de coherencia óptica de dominio temporal
- **P - OCT**, Tomografía de coherencia óptica polarizada
- **SS - OCT**, Tomografía de coherencia óptica tipo swept-source
- **TE**, Tratar y extender
- **UCV**, Universidad Católica de Valencia
- **VCP**, Vasculopatía polipoidea
- **VIH**, Virus de la inmunodeficiencia humana
- **EBV**, Virus del Epstein - Barr
- **VM**, Volumen macular
- **ZAF**, Zona avascular foveal
- **ZE**, Zona elipsoides



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 Aspectos fundamentales de la anatomía retino - coroidea

La retina es una delicada estructura de tejido nervioso especializado que se ha exteriorizado desde el diencefalo [Gupta et al. 2016]. Se localiza en la cara posterior del ojo extendiéndose desde el nervio óptico a la ora serrata y queda limitada internamente por el cuerpo vítreo y externamente por la coroides [Gupta et al. 2016].

Como parte del sistema nervioso central, entre sus componentes encontramos el equivalente a la sustancia gris (neuronas retinianas), a la sustancia blanca (capa de fibras nerviosas y plexiforme) y a las células de soporte (células de Müller y pequeños astrocitos) [Gupta et al. 2016]; todo ello organizado en una estructura fotosensible que hace posible los diversos tipos de función visual: la discriminación del detalle, la percepción del color, la visión con baja iluminación y la visión periférica.

En un análisis histológico, al realizar un corte transversal desde la retina interna hasta la externa, es posible distinguir las siguientes capas (Figura 1.1):

- Membrana limitante interna: Formada por la parte más interna de las células de Müller, en contacto con la cavidad vítrea.
- Capa de fibras nerviosas: Formada por los axones de las células ganglionares en su trayecto hacia el nervio óptico.

- Capa de células ganglionares: Está formada principalmente por 1.2 millones de células ganglionares. En menor número, es posible también identificar otros tipos celulares como células amacrinas, astrocitos, células endoteliales o pericitos.
- Capa plexiforme interna: Compuesta por circuitos neuronales que se producen entre células bipolares amacrinas y ganglionares.
- Capa nuclear interna: En ella encontramos los núcleos celulares de las interneuronas (células horizontales, células bipolares, células amacrinas y células interplexiformes) y de las células de Müller. Las células horizontales se localizan más cercanas a la plexiforme externa mientras que las amacrinas están más cerca de la plexiforme interna. El resto de células adopta una posición intermedia.
- Capa plexiforme externa: Formada por los axones de los fotorreceptores y su conexión sináptica con las células bipolares y horizontales.
- Capa nuclear externa: Conformada por los núcleos de los fotorreceptores (conos y bastones).
- Membrana limitante externa: Formada por las uniones intercelulares de células de Müller entre sí y con los fotorreceptores.
- Segmentos internos y externos de los fotorreceptores: Monocapa constituida por la unión de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores.
- Epitelio pigmentario de la retina (EPR) y su membrana basal.

### 1.1.1 Retina neurosensorial

La retina neurosensorial la constituyen elementos neuronales, gliales y vasculares.

#### *Elementos neuronales*

##### **Fotorreceptores**

Dentro de los elementos neuronales destacan los fotorreceptores (conos y bastones) que son las células encargadas de convertir un estímulo luminoso en una señal nerviosa mediante un proceso conocido como fototransducción.

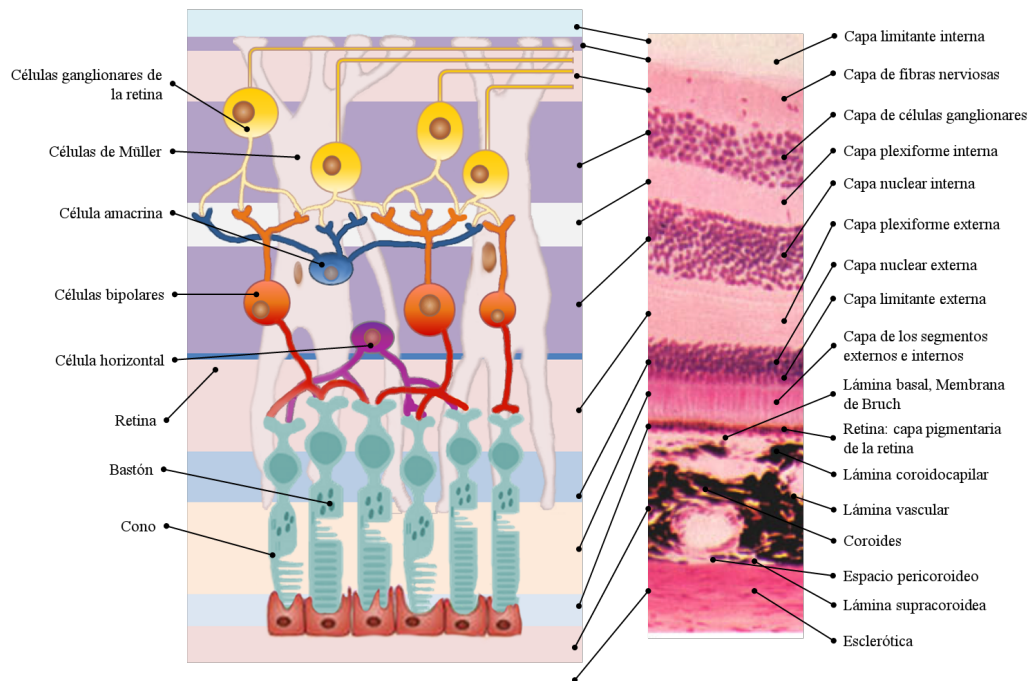


Figura 1.1: Capas y células de la retina.

La retina humana contiene entre 4 - 5 millones de conos y de 77 - 107 millones de bastones siendo los primeros las células predominantes en la zona central de la retina (fóvea o foveola) mientras que los bastones ganan en número a los conos en la retina más periférica [Hildebrand et al. 2011].

Los fotorreceptores están formados por (Figura 1.2):

- Segmentos externos (SE):

Los SE constituyen las estructuras encargadas de capturar la luz mediante las cromoproteínas (proteínas transmembrana fundamentales en la fototransducción) que albergan en su interior. Los bastones contienen múltiples discos laminares de membrana plasmática (estructuras separadas de la membrana celular) en una disposición similar a las pilas de moneda. Con esta disposición, aumentan la superficie de membrana plasmática disponible para el anclaje de las cromoproteínas [Tresguerres et al. 2005]. El SE de los bastones es delgado y alargado y contiene aproximadamente  $10^9$  moléculas de su principal cromoproteína que es la rodopsina. Por el contrario, los SE de los conos son más cortos y anchos y están formados a partir de invaginaciones de la propia membrana celular [Tresguerres et al. 2005; Hildebrand et al. 2011]). En el caso de los conos la proteína esencial para la fototransducción recibe el nombre de opsina de los conos.

Los SE de los fotorreceptores están rodeados de una matriz de mucopolisacáridos y se encuentran en contacto muy estrecho con las prolongaciones apicales del EPR. Este contacto con el EPR varía en función de si se produce con conos foveales, con conos perifoveales o bastones (Figura 1.3). En el caso de los conos foveales la parte distal de los SE de los fotorreceptores adquiere una morfología cónica y se detiene justo antes de contactar con la superficie del EPR dando lugar a un espacio que recibe el nombre de *espacio supracónico*. Este espacio supracónico es de mayor tamaño en los conos perifoveales, sin embargo, en el caso de los bastones es prácticamente inexistente siendo necesaria la microscopía electrónica para poder visualizar cualquier tipo de hueco [Spaide et al. 2011].

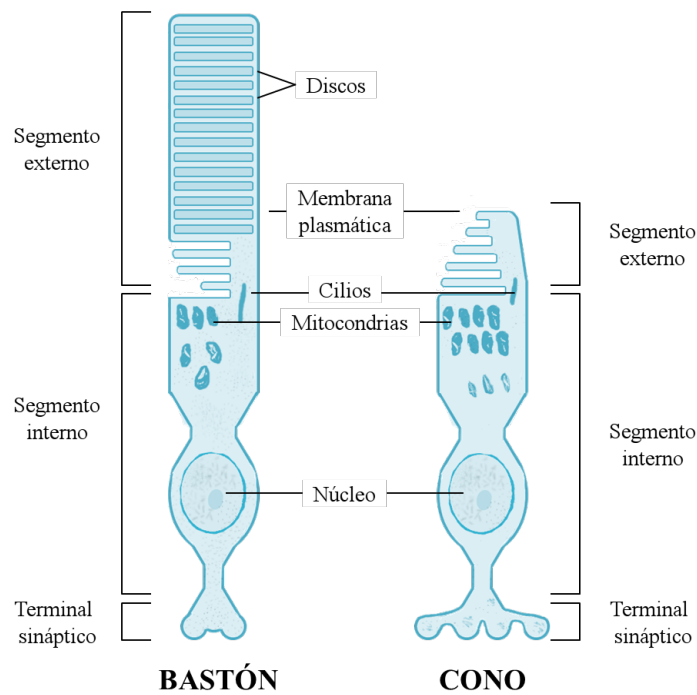
- Segmentos internos (SI):

Los SI contienen las estructuras celulares necesarias para mantener las funciones metabólicas de los fotorreceptores. Están conectados a los SE mediante un cilium no móvil con una estructura rígida central que recibe el nombre de *proceso calicial* [Spaide et al. 2011]. En los SI es posible diferenciar dos partes:

- La porción elipsoide: Es la más externa y más cercana a los SE. En ella, se encuentra un gran número de mitocondrias encargadas de producir el adenosín trifosfato (ATP) necesario para la fototransducción. En los conos subfoveales, las mitocondrias, lejos de presentar la típica forma arriñonada presente en la mayoría de las células del cuerpo humano, presenta una estructura alargada y estrecha ( $0,25 \times 3\mu$ , aproximadamente). Además, están estrechamente agrupadas y presentan una orientación paralela que las aventaja para la producción de energía frente a otras mitocondrias [Spaide et al. 2011].
- La porción mioide: Es la parte más cercana al núcleo celular y en la que predominan los orgánulos, como el retículo endoplásmico liso y rugoso, y los microtúbulos para el transporte intracelular. Es muy raro encontrar mitocondrias en esta porción [Hildebrand et al. 2011; Spaide et al. 2011].

- Cuerpo o soma celular

El cuerpo o soma celular corresponde con el núcleo de los fotorreceptores el cual contiene ácido desoxirribonucleico (ADN) no mitocondrial [Hildebrand et al. 2011]. Desde el punto de vista morfológico, los conos tienen un cuerpo celular de forma cónica localizado en una monocapa más cercana a la membrana limitante externa mientras que los bastones



**Figura 1.2: Partes de los fotorreceptores.**

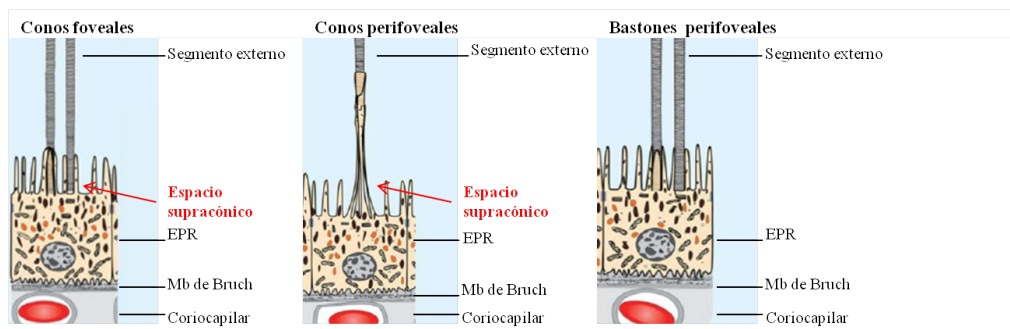
son estructuras más alargadas cuyo núcleo celular suele estar por debajo del de los conos ([Kolb 1995]) (Ver Figura 1.1).

- Fibra nerviosa y terminal sináptico

La fibra nerviosa o axón de los fotorreceptores transmite la señal de los fotorreceptores hasta su terminal sináptico. Este terminal sináptico transmite la señal a fotorreceptores vecinos e interneuronas (células horizontales y bipolares). El neurotransmisor de los fotorreceptores es el glutamato el cual se produce en condiciones de oscuridad o de despolarización celular [Hildebrand et al. 2011]. Cuando incide la luz, la célula se hiperpolariza mediante el proceso conocido como fototransducción.

El proceso de fototransducción es posible gracias a la sensibilidad de los fopigmentos a la luz.

En el caso de los bastones, como hemos mencionado, el fopigmento principal es la rodopsina. La rodopsina es una proteína transmembrana que consta de una parte proteica, opsina, y una no proteica el retinal. El retinal es un compuesto aldehído de la vitamina A y puede adquirir dos formas isoméricas: una estable 11 - cis unida a la opsina, que está presente en la oscuridad; y una todo - trans que se produce al incidir un fotón y disociar el retinal de la rodopsina.



**Figura 1.3: Interacción entre conos foveales, conos perifoveales y bastones con el EPR.** Reproducción basada en “*Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: Literature Review and Model*”; Spaide y colaboradores [Spaide et al. 2011].

Esta disociación hace que cambie el potencial de membrana del fotorreceptor y que finalmente se hiperpolarice. En el EPR, el todo - trans retinal vuelve a convertirse en su forma 11 - cis, permitiendo iniciar un nuevo proceso [Tresguerres et al. 2005].

La fototransducción en el caso de los conos es peor conocida. No obstante, se sabe que sus fotopigmentos son 100 veces menos sensibles a la luz que la rodopsina y que además tienen tres tipos de fotopigmentos siendo cada uno de ellos más sensible a una determinada longitud de onda [Tresguerres et al. 2005; Hoon et al. 2014]. Dentro de los conos se diferencian tres tipos: (1) los conos sensibles a longitudes de onda corta o azules, (2) los sensibles a longitudes de onda media o verdes y (3) los conos sensibles a longitudes de onda largas o rojos; siendo los conos sensibles al rojo más frecuentes (63 % o 2.9 millones) que los sensibles al verde (32 % o 1.4 millones) y a los de longitudes de onda corta ( 5 % o 0,2 millones) [Hildebrand et al. 2011].

### Interneuronas

Las células conocidas como interneuronas son las que conforman la capa nuclear interna y se encargan de transmitir el estímulo visual desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares. Hay distintos tipos:

Se denomina interneuronas a distintos tipos celulares cuyo núcleo celular se encuentra en la capa nuclear interna y que forman complejos circuitos neuronales a nivel de la capa plexiforme interna y externa modulando la información proveniente del fotorreceptor hasta su llegada a las células ganglionares.

- **Células bipolares:** Las células bipolares son las encargadas de conectar la retina externa neurosensorial con la retina interna mediante la transmisión del estímulo proveniente de los fotorreceptores. Esta primera sinapsis se realiza en la plexiforme externa y está modulada

por las células horizontales [Hoon et al. 2014]. En función de su respuesta al glutamato las células bipolares pueden ser de tipo “ON” cuando se activan (depolarizan) con la luz o de tipo “OFF” cuando se inactivan (hiperpolarizan) en condiciones lumínicas.

Se han descrito un total de 9 tipos morfológicos de células bipolares [Boycott et al. 1991]. Entre ellas encontramos 1 tipo de células bipolares para bastones y 8 diferentes para conos; diferenciándose las células bipolares para conos azules, conos verdes y conos rojos. Las células bipolares de los conos pueden ser de tipo “ON” y “OFF” mientras que las células bipolares de los bastones son únicamente de tipo “ON” [Hoon et al. 2014].

- Células horizontales: Las terminaciones de las células horizontales se localizan principalmente en la capa plexiforme externa donde son capaces de regular la transmisión del estímulo visual entre los fotorreceptores y las células bipolares. Estas células establecen conexiones con múltiples conos y bastones y sus prolongaciones pueden extenderse horizontalmente por toda la plexiforme externa.

Estudios que combinan microscopía óptica y electrónica con el método de Golgi han demostrado que en la retina humana existen tres tipos de células horizontales. Las células horizontales de tipo I que no poseen axon, las células horizontales de tipo II con axón y las células horizontales de tipo III que son semejantes a las células de tipo I aunque de mayor tamaño [Kolb et al. 1994].

Se sabe que las células horizontales pueden inhibir mediante mecanismos todavía en estudio (entre los que se encuentran la modulación de canales de calcio o el empleo de neurotransmisores inhibitorios como el ácido gamma-aminobutírico (GABA)) a los fotorreceptores modulando la cantidad de glutamato liberada por dichas células [Hirano et al. 2016].

- Células amacrinas: Estas células presentan su cuerpo celular situado en la capa nuclear interna y sus prolongaciones se extienden por la capa plexiforme interna. No reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sino sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y retroalimentando también a las células bipolares. A diferencia del resto de células retinianas, las células amacrinas usan diferentes neurotransmisores incluyendo el GABA, la glicina, la acetilcolina, la dopamina o diferentes péptidos [Hildebrand et al. 2011].

- Células interplexiformes: Estas células en general tienen su soma situado a nivel de la nuclear interna, entre los núcleos de las células bipolares, y se extienden por la capa plexiforme interna mediante ramificaciones. Estas células son postsinápticas para las células amacrinas y presinápticas para las células horizontales y bipolares por lo que reciben aferencias sinápticas desde la plexiforme interna y mandan su eferencia hacia la plexiforme externa creando un circuito de comunicación de información desde la retina interna hacia la externa.
- Células ganglionares: Estas células son las encargadas de transmitir la información visual desde la retina al cerebro [Hildebrand et al. 2011]. Las células ganglionares poseen un cuerpo celular voluminoso y ramificaciones dendríticas que forman sinapsis a nivel de la plexiforme interna con las terminaciones de las células bipolares y amacrinas. Su axón se sitúa a nivel de la capa de las fibras del nervio óptico que sólo se mieliniza en su porción extraocular.

### *Células gliales*

Se han descrito 4 tipos principales de células gliales.

#### **Células de Müller**

Las células de Müller constituyen el tipo celular glial esencial en la retina. Con su núcleo localizado en la capa nuclear interna, extienden sus ramificaciones tanto vertical como horizontalmente hacia todas las capas retinianas, rodeando tanto a neuronas como a vasos sanguíneos. Sus extensiones internas (también llamadas pies por su morfología aplanada) constituyen la membrana limitante interna mientras que, distalmente, la formación de fuertes complejos de unión entre ellas mismas y con los fotorreceptores conforman, cuando se ven de forma agregada, la membrana limitante externa [Provis 2001]. Las células de Müller terminan a nivel del borde interno de la parte mioide de los SI de los fotorreceptores [Spaide et al. 2011].

#### **Astrocitos**

Los astrocitos generalmente se encuentran en las capas más internas de la retina donde rodean a las células ganglionares, fibras nerviosas y a algunos vasos sanguíneos. Se piensa que puedan provenir a partir de células madre del nervio óptico [Provis 2001].

#### **Microglía**

Las microglía constituyen parte del sistema fagocítico y del retículo endotelial. Alcanzan la retina a través de la circulación sanguínea y, aunque generalmente se encuentran entre los axones de las células ganglionares, su movilidad hace que podamos encontrarlas en toda la retina [Provis 2001].

### **Oligodendroglía**

Los oligodendrocitos son los encargados del recubrimiento de mielina propio del sistema nervioso periférico. Como hemos comentado con anterioridad, la capa de las fibras del nervio óptico es amielínica y sólo se mieliniza por fuera ya del globo ocular. No obstante, en algunos casos, se objetiva la persistencia de mielina en estas fibras indicando que, de alguna manera, los oligodendrocitos pueden alcanzar el interior del globo ocular [Provis 2001].

#### **1.1.2 Epitelio pigmentario de la retina**

El EPR constituye uno de los tejidos metabólicamente más activos del cuerpo humano. Está conformado por una media de 3.5 millones de células [Panda-Jonas et al. 1996] estrechamente unidas formando una monocapa entre los fotorreceptores y la membrana de Bruch [Sinha et al. 2016]. Esta capa se extiende desde el borde del nervio óptico hasta la ora serrata y se continúa anteriormente con el epitelio pigmentario del cuerpo ciliar.

La densidad celular del EPR es mayor en la zona central de la retina ( 5.000 células/mm<sup>2</sup>), donde las células presentan una morfología hexagonal y un diámetro que llega a 14 µm en la zona foveolar. Sin embargo, a medida que nos alejamos de la zona central, la densidad celular disminuye (2.000 células/mm<sup>2</sup>) manteniéndose la función de barrera a expensas de un aumento en el tamaño celular (60 µm de diámetro máximo en la ora serrata) [Harman et al. 1997; Boulton et al. 2001]. Las células del EPR son células epiteliales polarizadas [Sinha et al. 2016]. Además de los orgánulos que se encuentran en la mayoría de las células (núcleo, aparato de golgi, mitocondrias...), las células del EPR tiene algunas particularidades relacionadas con su función (Figura 1.4) [Sinha et al. 2016; Spaide et al. 2011]:

- En su parte más apical las células están unidas por uniones intercelulares herméticas que bloquean el paso de agua e iones. Estas uniones fueron inicialmente descritas por Verhoeff, por lo que recibe el nombre de *membrana de Verhoeff*.
- En contacto con la retina neurosensorial presentan un gran número de microvellosidades que se interdigitan con los SE de los fotorreceptores. En estas microvellosidades frecuen-

temente se encuentran melanosomas los cuales predominan en la parte apical de la célula [Spaide et al. 2011].

- Contienen un gran número de fagosomas, lisosomas y microperoxisomas espacialmente repartidos por el citoplasma [Spaide et al. 2011].

A pesar de que el EPR no contribuye directamente a la función visual, constituye un elemento imprescindible para la misma [Sinha et al. 2016; Strauss 2005]. Tiene distintas funciones entre las que se encuentran (Figura 1.4):

- Función de transporte y de barrera: Las estrechas uniones apicales intercelulares del EPR junto con la membrana de Bruch (una matriz extracelular entre el EPR y la coriocalpilar) conforman la barrera hematorretiniana externa. El control del transporte activo y pasivo de agua e iones entre la retina externa y la coriocalpilar permite mantener el medio extracelular de la retina externa, hecho que resulta esencial para el mantenimiento de la visión [Sinha et al. 2016; Strauss 2005].
- Adherencia de la retina: No existen uniones per sé entre la retina neurosensorial y el EPR. Sin embargo, dado que la adherencia entre la retina neurosensorial y esta capa es vital para la visión se han desarrollado muchos mecanismos que mantienen la retina en su posición. Entre estos sistemas encontramos: (1) la interdigitación entre las microvellosidades apicales del EPR y los fotorreceptores, (2) la matriz interfotorreceptores, (3) la presencia de fuerzas hidrostáticas pasivas y (4) el transporte activo del líquido subretiniano por el EPR hacia el flujo vascular [Hildebrand et al. 2011].
- Absorción de la luz dispersada y desenfocada: Las células del EPR contienen abundantes gránulos de melanina que absorben la luz dispersada desde la retina reduciendo el estrés fotooxidativo en las células retinianas [Sinha et al. 2016].
- Fagocitosis y recambio de los SE: Cada célula del EPR está en contacto con una media de 45 fotorreceptores y sus microvellosidades fagocitan las partes distales de los SE. Los discos desprendidos de los SE son encapsulados en los fagosomas que, a su vez se fusionan con los lisosomas para su digestión [Sinha et al. 2016]. Parte del material de desecho es eliminado a través de la membrana de Bruch hacia la coriocalpilar mientras que otra parte de estos discos externos es reciclada reutilizándose en nuevos discos.
- Otras funciones: Las células del EPR secretan un gran número de factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor neutrófico

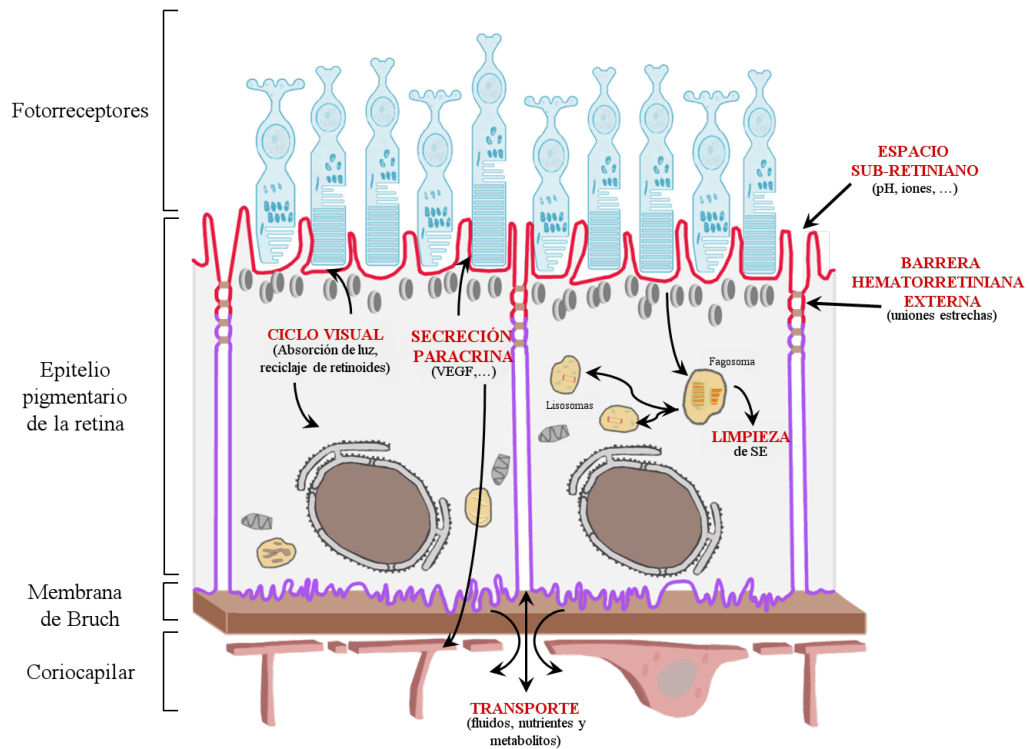


Figura 1.4: Funciones del EPR.

ciliar, factores de crecimiento derivados de plaquetas y de citoquinas inmunomoduladores contribuyendo a que el ojo sea un tejido inmunoprivilegiado [Strauss 2005].

### 1.1.3 Circulación retiniana

La retina presenta una vascularización dual (a excepción de la zona avascular foveal o de la periferia extrema de la retina que son lo suficientemente finas como para que puedan nutrirse únicamente mediante difusión coroidea ([Hildebrand et al. 2011; Provis 2001]); la arteria central de la retina y la circulación retiniana vascularizan la mitad interna de la retina; mientras que la mitad externa de la retina y el EPR están vascularizados por la circulación coroidea [Provis 2001].

- Vasculogénesis y angiogénesis: En la creación de la vascularización retiniana intervienen dos procesos. La vasculogénesis donde células precursoras inmaduras de tipo mesequimal que han migrado hacia la retina desde el nervio óptico se diferencian en tejido endotelial nuevo; y la angiogénesis donde células endoteliales preexistentes son estimuladas por factores locales (entre los que se encuentra el VEGF) para dar lugar a nuevos vasos sanguíneos [Provis 2001].

- Sistema arterial: La circulación retiniana aporta los nutrientes y el oxígeno necesario a todas las capas de la retina neurosensorial excepto a la capa de los fotorreceptores, los cuales se nutren a partir de la circulación coroidea [Lupidi et al. 2016]. En el centro de la mácula, se encuentra una zona que, en condiciones fisiológicas, presenta una ausencia total de capilares retinianos y se denomina *zona avascular foveal (ZAF)* [Lupidi et al. 2016].

La arteria central de la retina constituye una de las ramas de la arteria oftálmica, y nada más entrar en el globo ocular por el nervio óptico se bifurca en cuatro ramas principales para constituir las arterias superior, inferior, nasal y temporal de la retina las cuales se localizan a nivel de la capa de las fibras nerviosas. De ellas surgen pequeñas arteriolas que van a dar lugar a los plexos capilares. El desarrollo de nuevas técnicas de imagen como la tomografía de coherencia óptica con angiografía (angio - OCT) ha permitido un detallado estudio de la circulación retiniana, llegándose a distinguir tres plexos capilares: [Lupidi et al. 2016].

- Plexo capilar radial peripapilar: Localizado entre los axones de células ganglionares que forman la capa de células nerviosas [Yu et al. 2015].
  - Plexo capilar superficial o interno: A nivel de la capa de células ganglionares.
  - Plexo capilar profundo o externo: Discurre a nivel de la capa nuclear interna.
- Sistema venoso: Todo el drenaje del aporte vascular corre a expensas de las vénulas y la vena central de la retina, la cual drena en las venas oftálmicas o en el seno cavernoso directamente [Hildebrand et al. 2011].

#### 1.1.4 Coroides: Membrana de Bruch y capa vascular

La coroides o úvea constituye la parte posterior de la capa intermedia del globo ocular. Constituye una capa pigmentada y predominantemente vascular que se relaciona de forma interna con el EPR y de forma externa con la esclera. Histológicamente se pueden dividir 3 capas:

- Membrana de Bruch: La porción basal del EPR está unida a una membrana elástica que recibe el nombre de membrana de Bruch y que lo separa de la coriocapilar. En esta membrana se pueden distinguir 5 capas que son:
  - Membrana basal del EPR.

- Zona colagenosa laxa interna.
- Capa media de fibras elásticas.
- Zona colagenosa laxa externa.
- Membrana basal del endotelio de la coriocalpilar.

Con los años esta membrana compuesta por diferentes tipos de fibras elásticas y de colágeno se engrosa y sus capas se hacen menos diferenciables [Hildebrand et al. 2011].

- Capa vascular de la coroides: La coroides constituye la principal capa vascular del globo ocular. Tal es la importancia de su aporte vascular, que constituye el tejido con mayor flujo sanguíneo por unidad de todo el cuerpo humano [Tan et al. 2016c].

La vascularización coroidea, al igual que la retiniana, depende de terminales de la arteria oftálmica. La sangre entra en la coroides principalmente a partir de las arterias ciliares posteriores cortas y también contribuyen, aunque en menor medida, ramas terminales de las arterias ciliares posteriores largas [Hildebrand et al. 2011].

Dentro de la coroides es posible diferenciar tres capas de vasos:

- Coriocalpilar: Constituye la capa más interna de la coroides. Está formada por una monocapa de densos capilares separados, en condiciones normales, 20  $\mu$  de los fotorreceptores lo que favorece la difusión rápida de nutrientes y la oxigenación [Hildebrand et al. 2011].
- Capa de Sattler: Es la capa de vasos de calibre medio coroides, quedando delimitada entre la coriocalpilar y la capa de Haller.
- Capa de Haller: Es la capa más externa y la que está formada por vasos de mayor calibre, principalmente venas avalvulares que finalmente drenarán en las venas vorticosas.

La coroides aporta la vascularización necesaria a la retina externa, al EPR, a una porción del nervio óptico y constituye la única forma de intercambio metabólico en la ZAF. Una adecuada función y estructura coroidea son imprescindibles para el correcto funcionamiento de los fotorreceptores. Básicamente, dada su naturaleza vascular, cualquier alteración o enfermedad que pueda afectar a la vasculatura puede también afectar al estado coroideo [Tan et al. 2016c].

Histológicamente, el grosor coroideo se estima entre 0,1 mm en la zona más cerca a la ora serrata y 0,25 mm de grosor máximo en la zona posterior [Hildebrand et al. 2011]. Recientemente, el desarrollo de técnicas de imagen como la tomografía de coherencia óptica con tecnología tipo *Enhanced Depth Imaging* (OCT - EDI) ha permitido el análisis *in vivo* de la coroides; habiéndose objetivado variaciones en su grosor en relación con, entre otros, la edad, el sexo, variaciones en la presión intraocular, enfermedades metabólicas y enfermedades vasculares [Tan et al. 2016c]. Así mismo, estudios recientes han sugerido que pueda producirse un cambio en el grosor coroideo tras la administración de fármacos con acción antiVEGF [Koizumi et al. 2016b; Koizumi et al. 2016a].

- Supracoroides: Es la zona de transición entre la esclera y la capa de grandes vasos de la coroides.

### 1.1.5 Anatomía específica de la mácula

Se denomina mácula anatómica o polo posterior a la zona central de la retina de unos 5 - 6 mm de diámetro máximo, localizada entre las arcadas vasculares, que presenta dos o más capas de células ganglionares. La zona definida por los anatomistas como *mácula lútea* es la porción de retina posterior que contiene pigmento xantófilo. Esta coloración amarillenta, visible sobre todo en el paciente postmortem, se debe a la presencia de pigmentos de tipo carotenoides localizados en la capa de fibras nerviosas que aportan beneficios antioxidantes y de prevención de la fototoxicidad. En función de diferencias histológicas en la mácula se distinguen varias regiones:

- Perifovea: Es un anillo de unos 1,5 mm de diámetro que constituye la parte más externa de la mácula, ya en contacto con la retina periférica. A diferencia del resto del área macular, donde la vascularización es menor, presenta un gran número de capilares retinianos junto con un ratio elevado de bastones:conos (33 - 130:1). Además, el grosor de la capa de fibras nerviosas es mayor [Provis et al. 2005].
- Parafovea: Se considera parafovea a la región con morfología anular de unos 0,5 mm de anchura que se encuentra entre la perifovea y la fovea. A diferencia de la perifovea, su número de vasos retinianos es menor así como el ratio bastones:conos (4:1); sin embargo, presenta una mayor densidad de células ganglionares y la capa nuclear interna y la de fibras nerviosas son de mayor grosor [Provis et al. 2005].

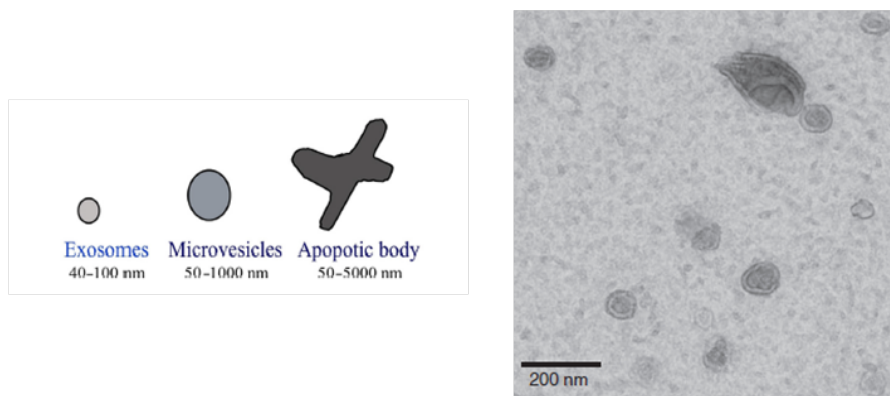
- **Fóvea:** Constituye la porción central del área macular y tiene un tamaño de 1,5 mm de diámetro. Es la región de la retina especializada en la agudeza visual y la visión del color. En ella, la capa de fotorreceptores únicamente está constituida por conos [Provis et al. 2005].
- **Foveola:** Constituye una pequeña depresión de unos 0,35 mm de diámetro localizada en el centro de la fóvea y es considerada como la zona de mayor agudeza visual pues coincide con la zona de máxima densidad de conos [Provis et al. 2013]. En esta zona los vasos sanguíneos, las células ganglionares y las capas nuclear interna y plexiformes están desplazadas, permitiendo que la luz llegue sin obstáculos a los SE de los fotorreceptores. En condiciones generales la foveola presenta una concavidad central llamada *clivus* y está centrada dentro de lo que se conoce como ZAF. Sus límites vienen definidos por la arcada capilar perifoveal que es un anillo anastomótico de capilares sanguíneos en los márgenes de la fóvea entre el plexo capilar profundo y el plexo capilar superficial [Lupidi et al. 2016; Provis et al. 2013].

## 1.2 Exosomas

El término exosoma fue inicialmente utilizado por Johnstone en 1970 [Johnstone 2005] cuando, trabajando en la maduración de reticulocitos, objetivó la presencia de cuerpos intracelulares de contenido homogéneo rodeados por membrana que, en oposición al fenómeno de la endocitosis celular, eran liberados al medio extracelular. No obstante, dicho término no fue registrado y en 1981 Trams y colaboradores [Trams et al. 1981] lo utilizaron para designar un tipo de vesículas provenientes de líneas celulares con actividad ectoenzimática.

En la actualidad, el término exosoma se emplea según su definición original; los exosomas son pequeñas vesículas extracelulares de entre 30 y 100 nm que se secretan al medio extracelular y tienen importantes funciones de comunicación celular [Ha et al. 2016]. No debemos confundir los exosomas con el resto de vesículas extracelulares de las que difieren principalmente por su origen y su tamaño. Hay tres tipos de vesículas [Ha et al. 2016]:

- **Cuerpos apoptóticos:** Vesículas de mayor tamaño, entre 50 a 5000 nm, que durante la apoptosis presentan su contenido (ADN; ácido ribonucleico (ARN) y proteínas, ...) a los macrófagos quienes las enguyen.



**Figura 1.5: Exosoma.** Imagen de exosomas con microscopía electrónica. Fuente: “*Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*”; Vlassov y colaboradores. [Vlassov et al. 2012]

- **Microvesículas:** Estas vesículas reciben múltiples nombres (ectosomas, micropartículas, exovesículas...). Presentan un tamaño medio (entre 50 y 1000 nm) y se crean directamente de una invaginación de la membrana plasmática.
- **Exosomas:** Vesículas de menor tamaño de entre 30 y 100 nm creadas a partir de endosomas intracelulares (Figura 1.5).

### 1.2.1 Proceso de formación de los exosomas y composición de los mismos

#### *Biogénesis:*

Los exosomas son secretados por todos los tipos celulares y pueden encontrarse en la mayoría de fluidos del cuerpo humano como la sangre [Caby et al. 2005; Ha et al. 2016], la saliva [Spielmann et al. 2011], la orina [Eissa et al. 2016; Nilsson et al. 2009], la leche materna [Kosaka et al. 2010], secreciones urogenitales [Foster et al. 2016; Vlassov et al. 2012] y el humor acuoso [Ha et al. 2016; Kang et al. 2014a; Vlassov et al. 2012]. En su formación se distinguen tres etapas [Ha et al. 2016]:

- **1.** Creación de vesículas endosómicas de la membrana plasmática.
- **2.** Invaginación de la membrana endosomal creando los cuerpos multivesiculares que contienen vesículas intraluminales. Este proceso de invaginación está mediado o bien por el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT), el cual selecciona determinadas proteínas para incluirlas en los cuerpos intraluminales, o bien por

determinadas moléculas como lípidos o proteínas los cuales también pueden interferir en el contenido de las vesículas.

- **3.** Estos cuerpos multivesiculares pueden fusionarse con los lisosomas para degradarse o bien con la membrana plasmática celular liberando las vesículas intraluminales que contienen que son los exosomas.

Así, los exosomas constituyen unas pequeñas nano esferas formadas por una bicapa lipídica que contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (ARN mensajero (mARN), microARN (miARN) y ARN no codificante) [Ha et al. 2016] que va a ser diferente en función de su célula de origen y de su proceso de formación.

La capacidad de la carga exosómica viene delimitada por el tamaño del exosoma. En general, la capacidad de carga tiene un diámetro máximo de entre 20 - 90 nm con un volumen interno de carga del exosoma similar al de los ribosomas eucarióticos [Nieuwenhuysen et al. 1978] de entre  $10^{-24}$  l lo que permite almacenar en su interior  $\leq 100$  proteínas y  $\leq 10,000$  nucleótidos de ácidos nucleicos [Vlassov et al. 2012].

Existe evidencia de que las células modulan el contenido de los exosomas en respuesta a estímulos extrínsecos [Iraci et al. 2016]. Condiciones de estrés tales como la hipertermia, hipotermia, hipoxia, infecciones virales o el estrés oxidativo inducen cambios notables en la composición de los exosomas [Jong et al. 2012; Eldh et al. 2010; Iraci et al. 2016]. Además, la producción de exosomas también puede ser regulada de forma extrínseca; determinados estudios han demostrado que al inhibir HRS (miembro de ESCRT - 0) en células de carcinoma escamoso o TSG101 (componente de ESCRT - 1) en células inmortalizadas de EPR se disminuye la producción de exosomas [Colombo et al. 2013; Ha et al. 2016]. Resultados concluyentes con los expuesto en estos dos puntos anteriores son los obtenidos por Atienzar-Aroca y colaboradores [Atienzar-Aroca et al. 2016] este mismo año. Nuestro grupo, al analizar la producción de exoxomas en células de cultivo del EPR, ARPE - 19, insultadas con etanol ha objetivado una mayor producción de exosomas, con una mayor expresión del receptor de VEGF (VEGFR) en la membrana de los mismos y un mayor contenido en su interior de mARN para VEGFR.

Tal es la importancia y el interés por la caracterización del contenido exosómico que se ha creado una base de datos interactiva ("*ExoCarta*") en la que, hasta la fecha, se han identificado 41,860 proteínas,  $> 7540$  ARN y 1116 moléculas lipídicas diferentes [Keerthikumar et al. 2016].

### ***Componentes proteicos:***

Como hemos comentado anteriormente, en la actualidad, se piensa que existen al menos 3 mecanismos independientes responsables de la selección de las proteínas de cada exosoma: el complejo ESCRT, los lípidos y unas proteínas entre las que destacan las tetraspaninas [Iraci et al. 2016; Villarroya-Beltri et al. 2014].

Dado que los exosomas derivan de los endosomas, dentro de sus proteínas constituyentes encontramos, entre otras: (1) proteínas de calor (Hsp70 y Hsp90); (2) tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82) o proteínas transmembrana que intervienen en la fusión, la migración y la adherencia celular; y (3) integrinas o moléculas de adhesión que a nivel celular facilitan la unión a la matriz extracelular y que en los exosomas promueven la unión de estos con su célula diana [Ha et al. 2016; They et al. 2002; Vlassov et al. 2012].

### ***Componentes de ARN:***

Dentro de los ácidos nucleicos que se han identificado dentro del exosoma encontramos mARN, miARNs (son pequeños ARN no codificantes que juegan un papel importante en el silenciamiento génico post - transcripcional [Yoon et al. 2016]) y ARN no codificante [Vlassov et al. 2012]. Este contenido en ácidos nucleicos es diferente del contenido de ARN de la célula de origen del exosoma [Mittelbrunn et al. 2011; Skog et al. 2008] lo que le da a esta vesícula unas propiedades diferentes. Aunque los fragmentos de ARN encontrados dentro del exosoma suelen ser menores de 200 nucleótidos, sigue siendo un ARN funcional que ha permitido la síntesis *in vitro* de diferentes proteínas [Vlassov et al. 2012]. De forma similar, miARNs exosómicos se transfieren de forma funcional a su célula diana modificando la expresión génica de la misma [Iraci et al. 2016; Ismail et al. 2013; Zhuang et al. 2012].

### ***Componentes lipídicos:***

La membrana lipídica de los exosomas está constituida por varios tipos de lípidos. Entre ellos encontramos la esfingomiélin y el gangliósido GM3 que le aportan propiedades de rigidez [Parolini et al. 2009]; la fosfatidilserina que interviene en el anclaje de proteínas y permite al exosoma la fusión con la membrana plasmática; y otros como la fosfatidilcolina, la ceramida, el colesterol o ácidos grasos saturados de cadena larga y corta [Ha et al. 2016].

### 1.2.2 Clasificación y aislamiento

El pequeño tamaño de las vesículas extracelulares hace que su aislamiento y su clasificación sea un reto. Los exosomas están presentes en la mayoría de los fluidos corporales [Ha et al. 2016], aunque su gran concentración en plasma, que llega a ser de 3.000.000 por microlitro [Zwicker et al. 2009], asociado a la facilidad de la extracción muestral, hacen que ésta sea la muestra más utilizada para su aislamiento [Lawson et al. 2016]. El aislamiento de vesículas extracelulares en plasma requiere la extracción sanguínea con un anticoagulante como el citrato [Lawson et al. 2016].

Posteriormente, lo más frecuente es emplear el método de la ultracentrifugación [Ha et al. 2016]. Se llevan a cabo repetidas ultracentrifugaciones hasta la consecución de un pellet donde quedan ya sólo las vesículas extracelulares. Esta técnica requiere mucho tiempo para su realización y es posible que el pellet además de exosomas pueda contener otras vesículas extracelulares o agregados proteicos. El empleo de la ultracentrifugación utilizando diferentes gradientes facilitaría el aislamiento únicamente de exosomas. Otras técnicas que se han empleado para el aislamiento exosómico es el marcaje con anticuerpos monoclonales; se han usado las moléculas CD63, CD81, CD82, CD9, molécula de adhesión de la célula epitelial (EpCAM) y Ras relacionado con proteínas (Rab5) que pueden ser usados de forma aislada o en combinación [Vlasov et al. 2012]. En este sentido, *HansaBiomed* ofrece una selección de productos denominados *ExoTest-Kit* que emplea CD63, CD81 y CD9 para la caracterización y el aislamiento exosómico que minimiza el tiempo requerido para ello [Vlasov et al. 2012]. Se han descrito también técnicas de ultrafiltración o de cromatografía líquida [Ha et al. 2016].

Una vez tenemos aislados los exosomas, para su caracterización se pueden usar, entre otras, la citometría de flujo, el western blot, el espectrómetro de masas y técnicas de microscopía o podemos diferenciarlos en función de las proteínas o los lípidos que los conforman [Ha et al. 2016]. En exosomas procedentes de células del EPR es posible reconocer además de marcadores exosómicos clásicos la presencia de VEGFR 1 y 2 [Atienzar-Aroca et al. 2016].

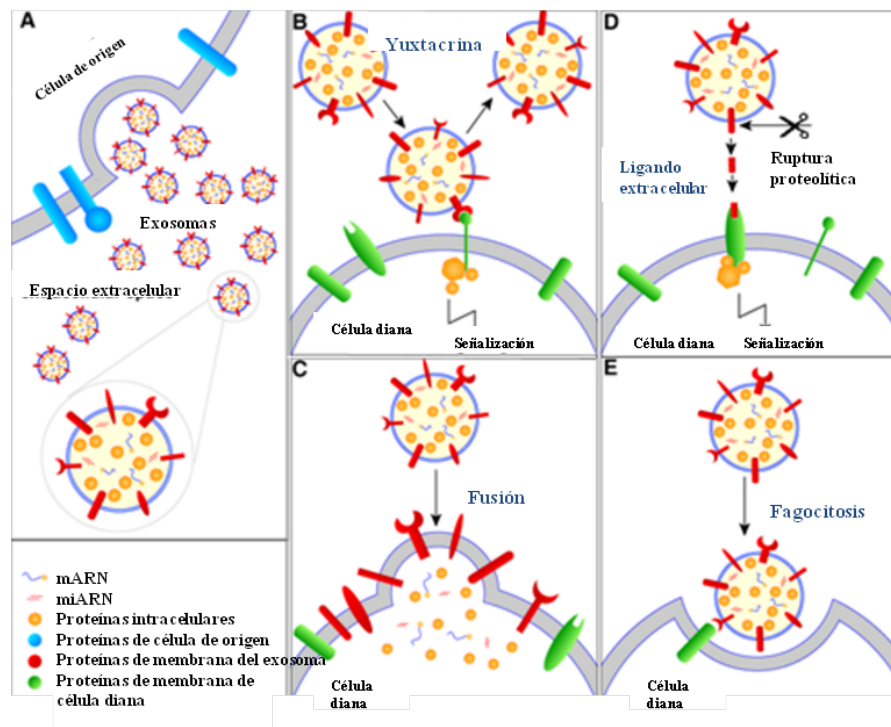
### 1.2.3 Funciones e implicaciones fisiológicas y patológicas

En un inicio, se pensaba que los exosomas constituían únicamente un mecanismo celular para eliminar proteínas innecesarias [Ha et al. 2016; Johnstone et al. 1987; Vlassov et al. 2012]. Sin embargo, en la actualidad, se piensa que la función de estas vesículas es actuar como mecanismo de comunicación celular. La comunicación intercelular dependiente de exosomas puede llevarse a cabo de diferentes maneras (Figura 1.6):

- **Yuxtacrina:** Los exosomas pueden presentar proteínas de membrana que interactúan con las proteínas de la célula diana, activándola [Rana et al. 2012].
- **Fusión:** Los exosomas pueden fusionarse con la célula diana transfiriéndole de forma no selectiva todo su contenido ( proteínas, RNA...) [Barry et al. 1999].
- **Ligando extracelular:** Proteasas de la membrana exosomal pueden actuar sobre proteínas de membrana exosómicas convirtiéndolas en ligandos que actúen sobre receptores de las células diana [Sanderson et al. 2008].
- **Fagocitosis:** Los exosomas pueden ser reconocidos y fagocitados por células presentadoras de antígenos las cuales pueden procesar la información transmitida por los exosomas y activar diferentes procesos celulares [Feng et al. 2010].

Este tipo de comunicación celular presenta la ventaja de poder activar a la vez múltiples células específicas y en sitios distantes. La transmisión de múltiples miARNs por los exosomas permite modificaciones rápidas en la expresión génica de dichas células diana proporcionándoles señales de crecimiento, división, diferenciación, supervivencia o respuesta al estrés o a la apoptosis [Vlassov et al. 2012].

La funcionalidad de los exosomas va a depender de la célula en que se origina [Vlassov et al. 2012]. Hasta la fecha, se les han conocido funciones en el proceso inflamatorio [Vlassov et al. 2012], la coagulación [Aharon et al. 2009], la angiogénesis [Atienzar-Aroca et al. 2016] y en la respuesta inmune donde pueden actuar como células presentadoras de antígeno o favoreciendo su desarrollo, como sugiere el hecho de que determinados miARN, como miR - 155 o miR - 181a, estén en altas concentraciones en los 6 primeros meses de leche materna y que luego disminuyan [Mittelbrunn et al. 2011]. Sin embargo, al igual que la composición y el proceso de formación exosómico puede regularse mediante estímulos extrínsecos, no sería de extrañar que dichas modificaciones o, por ejemplo, la activación de diferentes mecanismos de señaliza-



**Figura 1.6: Mecanismos de comunicación celular en los exosomas.** Reproducido y traducido de “*Exosomes and Shedding Microvesicles are Mediators of Intercellular Communication: How do they Communicate with the Target Cells?*”; Suresh Mathivanan, disponible online en [www. microvesicles.org](http://www.microvesicles.org) (A) Liberación de exosomas al medio extracelular, (B) Comunicación yuxtacrina, (C) Fusión con célula diana, (D) Comunicación mediante la formación de un ligando extracelular, (E) Fagocitosis por célula diana.

ción intercelular, puedan incluso conferir a los exosomas nuevas propiedades y/o funciones que todavía estén por descubrir [Iraci et al. 2016].

Además de en mecanismos fisiológicos, los exosomas también se han visto envueltos en mecanismos patológicos. A nivel infeccioso los exosomas constituyen una forma única que permite la transferencia intercelular de virus y priones [Qian et al. 2016] y se han visto envueltos en la patogenia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [Sun et al. 2016], con el cual compiten para la entrada en compartimentos endocíticos [Ha et al. 2016; Izquierdo-Useros et al. 2009; Vlassov et al. 2012]. Desde el punto de vista oncológico los exosomas pueden, entre otras cosas, favorecer un ambiente protumoral mediante la transmisión de proteínas [Ha et al. 2016; Rana et al. 2012]. En las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, se ha visto que los exosomas pueden transportar proteínas dañadas de neuronas enfermas a neuronas sanas favoreciendo el progreso de la enfermedad [Ghidoni et al. 2008; Ha et al. 2016; Iraci et al. 2016] y en la enfermedad de Alzheimer se encontraron proteínas exosómicas en las placas cerebrales [Iraci et al. 2016]. Debido a su papel en la respuesta inmune, recientemente se ha vinculado su presencia con la patogenia de enfermedades como la artritis reumatoide, el síndrome de Sjogren, o el lupus eritematoso sistémico [Tan et al. 2016d]. Así mismo, se han relacionado con el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 [Lawson et al. 2016; Safdar et al. 2016] y cardiovasculares como la aterosclerosis, el ictus y el síndrome coronario agudo [Lawson et al. 2016]; proponiéndose que unas proteínas que distribuyen los efectos beneficiosos del ejercicio (las exerquinas) usen los exosomas como método de transferencia [Safdar et al. 2016]; y su presencia en diferentes secreciones urogenitales los han relacionado con la infertilidad [Foster et al. 2016].

#### 1.2.4 Papel de los exosomas en la degeneración macular asociada a la edad

Se han relacionado los exosomas con distintas enfermedades oculares como el glaucoma [Hardy et al. 2005] o, más recientemente, con enfermedades retinianas [Locke et al. 2014; Wang et al. 2009]. Estudios recientes han objetivado que el EPR libera exosomas y que dicho proceso podría estar alterado en la DMAE [Locke et al. 2014]. La DMAE es una enfermedad degenerativa de la mácula que acontece en personas mayores y se caracteriza en fases iniciales por la presencia de drusas y alteraciones pigmentarias del EPR y en fases tardías por el desarrollo de atrofia geográfica o de neovascularización. Con la edad, se producen cambios en el EPR, la membrana de Bruch y la coroides; no obstante, la patogenia de la DMAE es multifactorial y, aparte del

envejecimiento, se ha detectado la influencia de factores inflamatorios, inmunológicos y genéticos [Lambert et al. 2016].

En relación con los exosomas y la DMAE, podemos encontrar:

- **Papel en la formación de drusas e interacción con el sistema del complemento:**

En condiciones normales, entre el EPR y la coroides es posible identificar proteínas plasmáticas y extracelulares. Con la edad, aumentan las actividades de apoptosis y exocitosis del EPR y de la coroides que se convierten en inmunológicamente activos [Chen et al. 2008a]. Las drusas son depósitos proteicos y de detritus celular que se localizan entre el EPR y la coroides [Crabb et al. 2002] y su hallazgo se relaciona con el envejecimiento pero su biogénesis sigue siendo tema de controversia [Khan et al. 2016]. Recientes estudios han objetivado, mediante técnicas de inmunohistoquímica y proteómica, la presencia de proteínas intracelulares del EPR como componentes de las drusas [Wang et al. 2009]. Se piensa que ese aumento de actividad exocítica del EPR que acontece con la edad, aumentaría el número de proteínas intracelulares y que éstas constituirían el sustrato anatómico para el desarrollo de las drusas. La formación de drusas está aumentada en pacientes con DMAE. Se han objetivado exosomas recubiertos por el factor del complemento C3; de forma que se piensa que alteraciones genéticas del CFH, (un biomarcador conocido para la DMAE [Lambert et al. 2016]) podrían desestabilizar la estructura exosómica, favoreciendo la liberación de las proteínas intracelulares en la zona de formación de drusas en pacientes con esta enfermedad [Wang et al. 2009].

- **Liberación de proteínas influyentes en la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), La  $\alpha$  A y  $\alpha$  B cristalinas:** Dentro de las proteínas liberadas por vía exosómica que se han relacionado con el desarrollo de la DMAE destaca el grupo de las  $\alpha$  cristalinas. La  $\alpha$  A y  $\alpha$  B cristalinas son un grupo de proteínas que se encuentran en el citosol y las mitocondrias del EPR y son secretadas en la zona apical de la célula por la vía exosomal [Kannan et al. 2016]. Se ha encontrado un aumento de estas proteínas en las drusas de pacientes con DMAE [Kannan et al. 2016]. Entre sus funciones destaca el proteger a otras células del EPR y a los fotorreceptores del estrés oxidativo [Kannan et al. 2016]. Además, estas proteínas también actúan como moduladoras de la angiogénesis [Xu et al. 2015b] y del VEGF [Kase et al. 2010]. Aunque los mecanismos reguladores de la vasculogénesis y angiogénesis son diversos y dependen del tipo celular, recientes estudios han objetivado una inhibición de la neovascularización al bloquear la  $\alpha$  A [Xu et al. 2015b]

y  $\alpha$  B [Kase et al. 2010] cristalina, pues modulan los niveles de VEGF y de VEGFR [Kannan et al. 2016; Kase et al. 2010; Xu et al. 2015b]. Resaltando la idea de que el material exosómico puede influir en la propia biogénesis de los exosomas, se ha objetivado que la inhibición en células de cultivo ARPE - 19 de las  $\alpha$  cristalinas bloquea la formación de exosomas por parte de estas células [Gangalum et al. 2016]. Otras proteínas también se ven involucradas en el proceso patológico de la DMAE. Un estudio experimental ha demostrado la presencia de proteínas fosforiladas en el humor vítreo tras situaciones de estrés oxidativo [Biasutto et al. 2013]. Al ser el vítreo un tejido libre de células se piensa que los exosomas son quienes modifican la composición proteica del mismo.

- **Respuesta al estrés oxidativo y promoción de la angiogénesis:** Atienzar-Aroca y colaboradores [Atienzar-Aroca et al. 2016], de nuestro grupo de investigación en la *Universidad Católica de Valencia (UCV)* tras estudiar el efecto en la producción exosómica en células del EPR ARPE - 19 insultadas con diferentes concentraciones de etanol, y analizar los cambios que se producen en células endoteliales venosas de cordón umbilical humano expuestas a estos exosomas, establecieron una relación entre el estrés oxidativo y la promoción de la angiogénesis. Se objetivó que las células del EPR dañadas producían mayor cantidad de exosomas con el receptor VEGFR1 y VEGFR2 en su membrana; además, estos exosomas contenían mayor cantidad de mRNA para VEGFR - 1 y VEGFR - 2 en su interior. Cuando estos exosomas interactuaban con células endoteliales de cordón umbilical se objetivaba un aumento de la angiogénesis que relacionaron con un aumento de la expresión de los receptores para el VEGF en estas células. Como hemos comentado con anterioridad, el contenido de los exosomas va a depender de su célula de origen; en este sentido cabe destacar que no todos los exosomas producidos en la retina o el EPR van a estimular la angiogénesis. Exosomas provenientes de células astrocíticas retinianas en un modelo experimental de neovascularización demostraron contener factores inhibidores de la angiogénesis, como la endostatina, disminuyendo la fuga capilar y el desarrollo de neovasos [Hajrasouliha et al. 2013].
- **Aumento de la angiogénesis en el EPR en respuesta a miARNs exosómicos:** Se ha visto que el virus de Epstein - Barr (EBV) produce una elevación celular mantenida de determinados miRNAs como el miR - 155 cuya sobreexpresión se ha relacionado con el crecimiento del cáncer de mama y con la angiogénesis [Kong et al. 2014]. Mediante el cocultivo de células de linfoma de burkitt infectadas con EBV con células del EPR (ARPE - 19), los autores Yoon y colaboradores [Yoon et al. 2016] demuestran la transmisión

exosómica de miR - 155 y el aumento consiguiente del VEGF en las células del EPR. Este VEGF es funcionante y promueve un patrón de angiogénesis en el endotelio de cordón umbilical. Otros microRNAs que se han relacionado con la DMAE son miR - 23a que parece estar disminuido en células del EPR en pacientes con DMAE [Lin et al. 2011] y la represión de hsa - mir - 361 - 5p *in vitro* dio lugar a un aumento de la vascularización [Grassmann et al. 2014].

- **Excreción vía exosómica de fármaco antiVEGF por el EPR:** El estudio realizado por Naga y colaboradores [Aboul Naga et al. 2015], objetiva la captación intracelular de un fármaco frecuentemente utilizado en la DMAE, el bevacizumab, su transporte en la célula mediante filamentos de actina y de miosina y su secreción fuera de ella dentro de los exosomas. Esta eliminación de bevacizumab del EPR por vía exosómica podría constituir un nuevo mecanismo del que dispone la retina para deshacerse de inmunocomplejos no deseados; sin embargo, permite también la llegada de bevacizumab a células vecinas.
- **Modificación de factores del complemento en respuesta a la oxidación:** Alteraciones en diferentes factores del complemento se han relacionado con un mayor riesgo de padecer DMAE [Lambert et al. 2016]. Entre ellos, los factores CD46 y CD59 constituyen factores reguladores del complemento con papel también en la adhesión retiniana cuyos niveles se ven disminuídos en condiciones de atrofia geográfica, neovascularización o cicatriz disciforme macular [Singh et al. 2012; Vogt et al. 2011]. Situaciones de estrés oxidativo, como la acontecida con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, parecen favorecer la eliminación de CD46 y C59 por vía exosómica disminuyendo sus niveles en el EPR [Ebrahimi et al. 2014]. Estos factores del complemento también intervienen en la formación del complejo de anclaje de ataque a membrana (MAC) sobre las células del EPR, por lo que si fallan los mecanismos exosómicos, este complejo puede quedarse unido de forma crónica al EPR dando un estado de inflamación mantenida que predispone a la DMAE [Lakkaraaju et al. 2014].

### 1.2.5 Aplicaciones diagnósticas y terapéuticas

Dado que los exosomas intervienen en la comunicación intercelular y participan en procesos fisiológicos y patológicos, presentan amplias implicaciones diagnósticas y terapéuticas.

#### *Aplicaciones diagnósticas:*

- **Papel como biomarcador:** Dada su presencia en condiciones patológicas y su relativa facilidad para su extracción y análisis, los últimos estudios resaltan el papel de los exosomas como biomarcadores. A nivel infeccioso, los exosomas contienen y presentan proteínas y ARN de agentes infecciosos pudiendo emplearse para su diagnóstico [Vlassov et al. 2012]. Desde el punto de vista oncológico, los exosomas se han empleado para la detección de, entre otros, tumores de próstata [Nilsson et al. 2009], pecho y ovario [Ha et al. 2016]. En este sentido, Mitchell y colaboradores [Mitchell et al. 2008] objetivaron niveles elevados en plasma de miR - 141, un miRNA expresado en pacientes con cáncer de próstata y que permitía diferenciar a estos pacientes de pacientes sanos. Su análisis ha identificado otras alteraciones como la diabetes mellitus [Chen et al. 2008b] o el estado de gestación [Gilad et al. 2008]. Además de los exosomas en plasma se han desarrollado métodos de detección de exosomas en orina [Nilsson et al. 2009] y en saliva [Spielmann et al. 2011] que tienen la ventaja de no constituir métodos invasivos con resultados muy prometedores [Vlassov et al. 2012]. Un ejemplo de ello es la detección de exosomas en orina (miR - 15b, miR - 34a, and miR - 636) como biomarcadores del daño renal en pacientes con diabetes mellitus [Eissa et al. 2016].

Los exosomas o su contenido también pueden emplearse como biomarcadores en la DMAE. Se ha visto que proteínas secretadas en vivo por el EPR en pacientes con DMAE neovascular se pueden encontrar en el humor acuoso, pudiendo emplearse su identificación como biomarcador de la DMAE [Kang et al. 2014a]. En concreto, Kang y colaboradores [Kang et al. 2014a] encontraron un aumento de catepsina D y citoqueratina 8, entre otras proteínas, en pacientes con DMAE.

**Aplicaciones terapéuticas:**

- **Inducir la regeneración tisular:** Los exosomas permiten la liberación de factores de crecimiento, proteínas, mRNA, miARN, ARN no codificante o lípidos que promueven la regeneración tisular. Se han empleado en la terapéutica de enfermedades cardiovasculares [Lai et al. 2010], neurológicas [Pusic et al. 2014]) y oncológicas [Ohno et al. 2013]. Por ejemplo, Lai y colaboradores [Lai et al. 2010] investigaron el papel de los exosomas en el infarto de miocardio objetivando que vesículas exosómicas eran capaces de reducir el área de infarto.
- **Terapia con células madre:** Recientemente el empleo de miARNs derivados de células madre mesenquimales de cordón umbilical han sido capaces de inhibir la replicación del virus de la hepatitis C. Se piensa que los miARNs presentes en estas células codifican moléculas funcionantes como let - 7f, miR - 145, miR - 199a y miR - 221 las cuales son capaces de inhibir la replicación viral [Qian et al. 2016].
- **Constituir vesículas de transporte de pequeñas moléculas, proteínas y ácidos nucleicos:** Los exosomas presentan baja inmunogenicidad comparados con las células, son altamente estables en sangre y en suero y pueden distribuir su contenido a células específicamente preseleccionadas [Clayton et al. 2003; Iraci et al. 2016; Kooijmans et al. 2012]. Además, estudios recientes han demostrado su paso de la barrera hematoencefálica permitiendo la llegada de fármacos a estas localizaciones [Pardridge 2012]. Se pueden utilizar en este sentido exosomas producidos por determinados tipos celulares o exosomas con un contenido modificado experimentalmente. Se han desarrollado exosomas con cúrcuma para la enfermedad inflamatoria [Anand et al. 2007] o con proteínas como la catalasa para la enfermedad del parkinson [Ha et al. 2016; Pardridge 2012]). A nivel oncológico, destaca su uso como vehículos transportadores de agentes quimioterápicos con el objetivo de disminuir los efectos secundarios de los mismos o transportando determinados miARNs que pueden modular la expresión génica y el crecimiento celular. Por ejemplo, Tian y colaboradores [Tian et al. 2014] emplearon exosomas con doxorrubicina y objetivaron la supresión del crecimiento tumoral en cáncer de mama en ratones. Ohno y colaboradores [Ohno et al. 2013] llevaron a cabo un estudio en que empleaban miARN exosómico cuya diana era el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) presente en las células del cáncer de mama validando el uso de los exosomas para las células que expresen dicho factor. En el mismo sentido, Koyama y colaboradores [Koyama et al. 2016] han empleado

exosomas derivados de células tumorales modificados genéticamente para que expresen en su superficie antígenos de parasitación por *Mycobacterium tuberculosis* objetivando una supresión en el crecimiento tumoral al impedir el privilegio inmunitario que presentan las células cancerosas.

- **Creación de vesículas que mimetizan los exosomas:** Aunque se avanza rápido en la creación de exosomas con un objetivo terapéutico es muy difícil su creación a gran escala hecho que pudiera ser deseable en la elaboración de vacunas. Por ese motivo, se han producido nano vesículas que mimetizan los exosomas [Kooijmans et al. 2012].

En la DMAE hasta la fecha se han desarrollado nanopartículas cargadas con péptidos de  $\alpha$  A cristalina y  $\alpha$  B cristalina minichaperonas consiguiendo proteger a las células del EPR del daño oxidativo y de la muerte celular [Kannan et al. 2016], por lo que no sería de extrañar que en los próximos años se desarrollen vesículas que mimeticen a los exosomas con similares funciones. Además, se ha visto un aumento de la angiogénesis en el EPR en respuesta a miARNs exosómicos [Yoon et al. 2016], por lo que cabría esperar resultados favorables al emplear exosomas modificados con proteínas o ácidos nucleicos con capacidad de inhibir el desarrollo de neovasos.

### 1.3 Abordaje diagnóstico de las enfermedades de la retina

El abordaje diagnóstico de las diferentes enfermedades retinianas se realiza mediante una adecuada exploración clínica junto con el empleo de técnicas de imagen especializadas. Para una correcta evaluación clínica, lo más frecuente es el uso combinado de técnicas de medición de la agudeza visual (AV) y un examen minucioso del estado del fondo de ojo que se puede documentar de forma gráfica mediante la realización de una fotografía del mismo o retinografía.

El creciente desarrollo y evolución de las técnicas de imagen en oftalmología ha permitido complementar en gran medida las exploraciones clínicas, haciendo visibles lesiones y estructuras prácticamente inaccesibles con la exploración clínica. Las nuevas técnicas de imagen han permitido el diagnóstico de nuevas entidades clínicas, así como la precocidad diagnóstica en otras ya conocidas; y han permitido un correcto seguimiento y valoración de las enfermedades a lo largo de su curso clínico, la adecuación de regímenes de tratamiento y la evaluación de su respuesta al tratamiento.

En el caso de la DMAE un adecuado diagnóstico y la precocidad en el mismo pueden llegar a ser determinantes para la afectación funcional final y para el pronóstico de la visión [Loewenstein

2007]. Además, un detallado análisis de las capas retinianas y el estado de la retina mediante las nuevas técnicas diagnósticas ha llevado al desarrollo y descubrimiento de nuevos parámetros que pueden ser utilizados como factores pronósticos de la AV final [Schmidt-Erfurth et al. 2016].

### 1.3.1 Mejor agudeza visual corregida

La medición de la AV es la prueba más sensible de la integridad del sistema visual: nos indica que los medios oculares son claros, la imagen está enfocada claramente en la retina, la vía visual aferente está funcionando y la corteza visual ha interpretado adecuadamente los estímulos recibidos; sin embargo, no es específica de la patología retiniana.

La AV se puede definir como la capacidad de percibir y diferenciar dos estímulos separados o, dicho de otra manera, es la capacidad de resolución espacial del sistema visual [Falkenstein et al. 2008]. La máxima capacidad de discriminación de imágenes teórica viene definida por la distancia mínima entre conos en la región foveal que es de 0,004 mm [Curcio et al. 1987]. Esta separación mínima detectable entre las imágenes puede expresarse en términos de AV. Así, el ángulo mínimo que se hace perceptible en un ojo normal es de 0,5 minutos de arco. Sin embargo, la AV clínicamente «normal» se sitúa entorno a 1 minuto de arco por la influencia de factores tanto físicos (iluminación de la sala, aberraciones ópticas...) como psicológicos (fatiga física o psíquica).

Para medir la AV se utilizan los optotipos. El término proviene de dos palabras griegas: *optós*, que significa «visible o relativo a la visión» y *typós*, que significa «marca». Los optotipos son figuras o símbolos que se emplean para medir la AV. En ellos, la figura o símbolo ha de estar compuesta por varios rasgos, cada uno de los cuales debe subtender un ángulo determinado a una distancia dada y los optotipos deben exponerse en condiciones adecuadas de luz y contraste. La AV en visión lejana se puede medir desde 4 - 6 m, si bien se recomienda utilizar una distancia superior a 5 m para evitar errores por la acomodación o el tamaño relativo de la imagen. Es importante identificar la distancia para la que cada optotipo está diseñado y calibrado y así ajustar correctamente la distancia de presentación.

La historia moderna de los optotipos se inicia en el 1862, cuando el holandés Herman Snellen publica sus optotipos [Gonzalez Martin-Moro et al. 2016]. No obstante, desde entonces se han desarrollado nuevas técnicas de medición de la AV. En la actualidad los principales diseños de optotipos son:

- **Optotipos de escala aritmética o tipo Snellen:** Constituye el diseño más utilizado en la práctica clínica cotidiana [Gonzalez Martin-Moro et al. 2016]. No obstante, este optotipo presenta determinadas limitaciones que han sido documentadas en cuanto a su diseño [Falkenstein et al. 2008].
  - Progresión inconsistente en el tamaño de carta de una línea a otra.
  - Número desigual de letras por cada fila.
  - Desigual legibilidad de las letras que se utilizan.
  - Espaciamiento desigual relación entre las letras y las filas.
  - Existencia de grandes lagunas entre los niveles de agudeza en el extremo inferior de la tabla (20/80 - 20/400).
  - Variabilidad en la medida con los cambios de iluminación y contraste de fondo.

La escasa fiabilidad de las tablas de Snellen se ha observado en muchos estudios con anterioridad y la variabilidad de la agudeza de Snellen test - retest entre distintas visitas varía de  $\pm 0,18$  a  $\pm 0,159$  logMAR en buenas visiones y de  $\pm 0,29$  a  $\pm 0,33$  logMAR en peores visiones.

- **Optotipos de escala logarítmica o de Bailey - Lovie:** Estos optotipos fueron diseñados a finales de los años 70 a partir de un modelo inicial propuesto en 1976 por Bailey and Lovie y surgen con el objetivo de conseguir una máxima estandarización en la medida de la AV. Tras su descripción en detalle por Ferris y colaboradores en 1982 [Ferris et al. 1982], se convierten en los optotipos adoptados por el cuadro *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) (Figura 1.7). Este optotipo ha demostrado en repetidas ocasiones ser muy repetitivo y fiable tanto en altas como en bajas visiones. Incluso en el rango de visión de cuenta dedos es posible una adecuada medida de la AV al modificar la distancia de presentación del optotipo (se puede pasar desde los 4 metros a 1 o 2 metros). Su variabilidad se ha estimado en torno a  $\pm 0,07$  logMAR a  $\pm 0,16$  logMAR en buenas visiones y de  $\pm 0,15$  logMAR a  $\pm 0,2$  logMAR en casos de baja visión [Falkenstein et al. 2008]. Las principales ventajas de este optotipo son [Falkenstein et al. 2008]:
  - Progresión geométrica y regular del tamaño y el espaciamiento de las letras, siguiendo una escala logarítmica en pasos de 0,1 unidades de registro. El espacio entre las filas y entre las letras es igual al tamaño de las letras.



**Figura 1.7:** Optotipo tipo cuadro Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS). Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia.”

- Empleo del mismo número de letras en cada fila. La fiabilidad en la medida de la AV aumenta al incrementar el número de letras cerca del tamaño umbral. Se acepta que al menos tienen que existir cinco letras por línea de optotipos.
- Legibilidad comparable de la tipografía tipo *Sans Serif* de letras utilizadas.
- Disminución de los cambios en iluminación y en contraste de fondo.

Todas estas ventajas han hecho que, en la actualidad este tipo de optotipo sea el empleado en la mayoría de ensayos y estudios clínicos, donde la adecuada medida de la AV puede ser crucial. Las mediciones de Snellen son en muchos casos inadecuadas y poco reproducibles, especialmente, en el rango de baja visión, por lo que en patologías como la DMAE donde la AV puede estar muy disminuída, estudios recientes recomiendan el empleo de optotipos de escala logarítmica [Falkenstein et al. 2008].

Se han desarrollado diferentes tipografías basadas en estos diseños del cuadro ETDRS con el objetivo de que los optotipos fueran igualmente legibles en cada nivel de AV [Treacy et al. 2015].

- Tipografía tipo Sloan: Es la tipografía originaria del ETDRS. Se basa en el empleo de las letras C, D, H, K, N, O, R, S, V, y Z. En ella cada tamaño de letra es de 0,1 unidades logarítmicas.
- Tipografía tipo British: Está basada también en el uso letras del alfabeto romano, incluyendo las siguientes: D, E, F, H, N, P, R, U, V y Z.
- Tipografía tipo C de Landolt: Este tipo de tipografía consiste en la utilización de un anillo que tiene un hueco, dando por lo tanto una imagen similar a la letra C cuando dicho hueco está a la derecha. Este hueco puede estar en varias posiciones (por lo general a la izquierda, derecha, abajo, arriba) variando 45° entre posiciones intermedias. Su uso supone una ventaja en poblaciones no familiarizadas con el alfabeto romano y desde 1996, tras su propuesta por Ferris FL y colaboradores [Ferris et al. 1996] como herramienta estandarizada para la medición de la AV en procedimientos de investigación, se ha consolidado como el optotipo de referencia a nivel internacional [Treacy et al. 2015].
- Tipografía tipo E tumbada: Al igual que la C de Landolt es útil en poblaciones con desconocimiento del alfabeto romano por lo que se emplea de forma frecuente en la práctica clínica. La letra E es mostrada en 4 posiciones (izquierda, derecha arriba y abajo) [Treacy et al. 2015].

Aunque el objetivo del desarrollo de los optotipos de base logarítmica era llegar a una estandarización de la medida de la AV, la variabilidad de los optotipos y de las circunstancias exploratorias hace que este hecho no sea una tarea fácil de conseguir. Recientemente, Treacy y colaboradores [Treacy et al. 2015] tras la realización de un estudio que comparaba el empleo del ETDRS con tipografía Sloan versus la tipografía C de Landolt y la tipografía E tumbada, objetivaron que se obtenía hasta una línea de AV final menos con la tipografía C de Landolt en pacientes con peores visiones, y que no había cambios significativos entre la tipografía E tumbada y el ETDRS - Sloan.

### 1.3.2 Retinografía

Las retinografías o fotografías a color del fondo de ojo constituyen registros gráficos de la apariencia de la retina en el momento de la captura. Las primeras imágenes fotográficas del fondo de ojo fueron obtenidas a finales del siglo XIX, momento en que se desarrolló el primer retinógrafo [Abramoff et al. 2010; Bernardes et al. 2011]. Al igual que sucede con la visión, para realizar una fotografía del fondo del ojo las estructuras oculares deben ser lo suficientemente transparentes como para que las pueda atravesar la luz y formarse una imagen [Abramoff et al. 2010].

#### *Utilidades*

La retinografía es una prueba de imagen no invasiva que se practica con frecuencia en la práctica clínica habitual debido al gran número de utilidades que presenta, entre las que se encuentran:

- **Cribado de enfermedades sistémicas y retinianas:** El empleo de la retinografía permite diferenciar ojos sanos de ojos con lesiones permitiendo el diagnóstico de la mayoría de las patologías retinianas. Además, la retina es el único tejido en que se pueden visualizar los vasos sanguíneos *in vivo* de un modo no invasivo. Por ello, el examen de fondo de ojo permite, además del diagnóstico de patologías oculares, la detección de procesos hipertensivos, inflamatorios o cardiovasculares. En este sentido, en los últimos años se han desarrollado numerosos métodos de telemedicina. Mediante la realización de fotografías de fondo de ojo se puede valorar la existencia de patologías como la hipertensión arterial [Michelson et al. 2011] o la diabetes mellitus [Zhang et al. 2016].
- **Ayuda a interpretar otras pruebas diagnósticas como la autofluorescencia, la angiografía o la tomografía de coherencia óptica:** En muchas ocasiones es necesaria la valoración concomitante de diferentes pruebas de imagen para poder llegar al diagnóstico de enfermedades retinianas.
- **Registro gráfico de estado retiniano y gradación de la afectación:** La posibilidad de disponer de un registro gráfico de la parte posterior del globo ocular posibilita el contar con una descripción fotográfica del estado del cuerpo vítreo, la retina, el EPR y alteraciones marcadas a nivel coroideo mucho más fidedigna y rica en detalles que cualquier descripción oral o escrita que se pueda realizar. Las retinografías además, cuentan con la ventaja de permitir diferenciar mayor cantidad de detalles retinianos y de una forma más fácil que

la exploración oftalmoscópica directa. Este hecho ha determinado que, por ejemplo, la realización de una fotografía a color del fondo de ojo sea más fiable para la gradación de la retinopatía diabética que la exploración directa [Scott et al. 2008; Kinyoun et al. 1992]. La clasificación internacional para la DMAE también se ha establecido en función del análisis de retinografías [Ferris et al. 2013; Liew et al. 2016; Scholl et al. 2004]. Además, estudios recientes han demostrado que las características fundoscópicas del ojo contralateral a la DMAE neovascular unilateral podrían ofrecer información respecto a los signos de riesgo para desarrollar cada uno de los tipos de lesiones neovasculares [Gallego-Pinazo et al. 2016].

- **Seguimiento de patologías retinianas:** Mediante el estudio de fotografías seriadas del fondo de ojo se puede valorar la existencia de cambios en la afectación retiniana.
- **Realización de tratamientos y valoración de la respuesta a los mismos:** Ya sea mediante el análisis informatizado [Boiko et al. 2016] o *in vivo* de las imágenes, éstas pueden servir como guía para la realización de procedimientos láser [Boiko et al. 2016; Solouma et al. 2002].

### *Tipos*

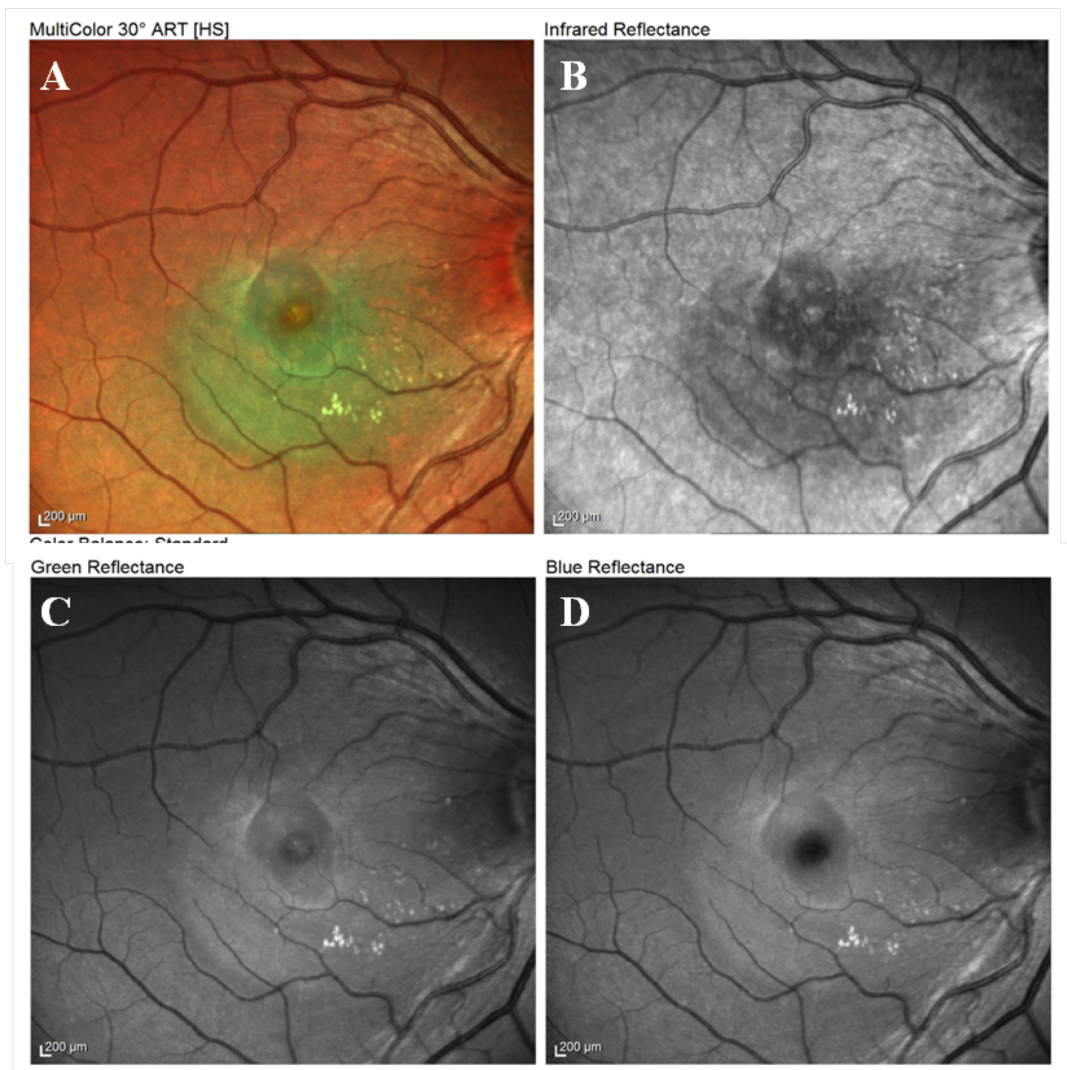
- **Fotografía analógica / Fotografía digital:** La fotografía digital, que comenzó a realizarse a mediados de 1960 [Bernardes et al. 2011], se realiza de la misma forma que la fotografía convencional pero, en lugar de realizarse con una película fotográfica, las cámaras digitales utilizan un sensor que finalmente transforma la imagen en píxeles de diferente intensidad [Patton et al. 2006]. A pesar de que la fotografía digital todavía no ha llegado a adquirir los niveles de resolución de la fotografía convencional, el desarrollo de esta técnica en los últimos años ha permitido la obtención de imágenes con muy alta resolución que suelen ser suficientes en la mayoría de los escenarios clínicos [Patton et al. 2006] (Figura 1.8). En contraposición, la digitalización de las imágenes de fondo de ojo ofrece diferentes ventajas entre las que se encuentran [Bernardes et al. 2011; Patton et al. 2006]:
  - Accesibilidad rápida a la fotografía que permite una valoración rápida de la misma; si el resultado es de baja calidad la fotografía puede repetirse de forma precoz.



**Figura 1.8: Retinografía color.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia”.

- Facilidad en la realización de duplicados y en el almacenamiento. A diferencia de la fotografía analógica con película fotográfica no se produce un deterioro de las imágenes con el paso del tiempo.
- Alta transmisibilidad de las imágenes que permite el desarrollo de estrategias de telemedicina. Esta facilidad de transmisión es de gran utilidad en poblaciones rurales o aisladas que no dispongan de un retinólogo experto.
- Posibilidad del empleo de herramientas digitales de mejora de la calidad de la imagen o de herramientas de software para análisis cuantitativo de las mismas.
- Posibilidad de desarrollo de grandes bases de datos en investigación o programas de cribado.
- Menor impacto medioambiental que las películas de 35 mm.

- **Fotografía con filtros:** Con el objetivo de mejorar la visibilidad de algunas estructuras o lesiones en el fondo de ojo, en la retinografía pueden utilizarse filtros de contraste para modificar el espectro de la fuente de iluminación [Bernardes et al. 2011] (Figura 1.9).
  - Filtro verde: La luz verde es totalmente reflejada por las células del EPR, sin embargo, es completamente absorbida por la sangre. Esta diferencia permite que, con el empleo de estos filtros, se consiga un mayor contraste para la visualización de la trama vascular, hemorragias, exudados y drusas.
  - Filtro rojo: La luz roja es poco absorbida por el EPR por lo que nos permite una mayor visualización de la coroides y estructuras coroideas.
  - Filtro azul: La luz azul permite una mayor visualización de las capas retinianas internas. Esta longitud de onda es parcialmente atenuada por el EPR por lo que nos puede ayudar en la diferenciación de los tipos de drusas en la DMAE. Las pseudo-drusas reticulares son más fácilmente identificables con este tipo de filtro [De Bats et al. 2016].
  - Fotografía multicolor: La fotografía multicolor integra el uso de los tres filtros anteriores maximizando la visualización de las lesiones a cada uno de los niveles (Figura 1.9). El empleo de la fotografía multicolor puede facilitar la visualización de determinadas alteraciones en le fondo de ojo presentes en la DMAE como pseudodrusas reticulares o alteraciones fibrovasculares; además puede realizarse en condiciones no midriáticas y se ve menos artefactada por la opacidad de medios [Tan et al. 2016a].
- **Cámara no midriática / Cámara midriática:** Las cámaras no midriáticas son aquellas que pueden capturar imágenes con las pupilas pequeñas, adaptándose a la dilatación pupilar fisiológica. Esta característica hace que sean adecuadas para las unidades de atención primaria y los programas de cribado. Por el contrario, las cámaras midriáticas son más sensibles que las no midriáticas y proporcionan imágenes del fondo de ojo de mayor calidad. Por este motivo, se prefiere su uso en unidades especializadas y en investigación clínica [Bernardes et al. 2011].
- **Fotografía a color convencional / Fotografía a color de campo amplio:** Las cámaras clásicas se desarrollaron para tomar imágenes de los 30° centrales de visión. Modelos posteriores han aumentado el campo de visualización hasta los 55° y el empleo de estrategias dinámicas de captura en que se pide al paciente que mueva el ojo en diferentes



**Figura 1.9: Retinografía color con filtros y multicolor.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia”. (A) Fotografía multicolor, (B) fotografía con filtro rojo, (C) fotografía con filtro verde y (D) fotografía con filtro azul.

posiciones permite la fotografía de un campo aproximado de hasta 75°. No obstante, en muchas ocasiones, lesiones en la retina periférica pueden pasar desapercibidas. El empleo de cámaras de campo amplio permite la fotografía de los 200° centrales en una sola toma [Tan et al. 2016b].

- **Sistema fotográfico estático / portátil:** En los últimos años se han desarrollado cámaras de fondo de ojo portátiles. Estos dispositivos se emplean sobre todo en programas de cribado o donde hay dificultad para la llegada de la asistencia sanitaria [Zhang et al. 2016].

### 1.3.3 Tomografía de coherencia óptica

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una prueba de imagen no invasiva que utiliza ondas de luz y proporciona imágenes transversales de alta resolución similares a un corte histológico de diferentes partes del globo ocular, entre ellas de la retina.

El funcionamiento de la OCT es análogo al de la ecografía. Ambas técnicas se basan en la medida de la latencia y la intensidad de la onda que se refleja tras hacer incidir una determinada onda sobre un tejido. La principal diferencia estriba en que en el caso de la OCT la onda que se proyecta no es acústica sino luminosa con una longitud de onda cercana al infrarrojo de 800 - 870 nm. Dado que la detección directa de los ecos de luz no es posible debido a la alta velocidad de la luz, las mediciones se realizan analizando la correlación de las reflexiones entre un espejo de referencia y un espejo de muestra mediante el interferómetro de Michelson [Murthy et al. 2016].

El estudio del tejido retiniano por OCT es posible gracias a las propiedades ópticas de los tejidos. Cuando el haz lumínico proyectado llega al tejido retiniano, éste puede sufrir varios fenómenos: absorción (la luz se transforma en calor), transmisión (la luz sigue su trayectoria original hacia tejidos más profundos) o dispersión (cambios en el índice de refracción de los tejidos modifican la trayectoria de la luz). Cada tejido tiene unas propiedades diferentes de reflectividad. La OCT es capaz de cuantificar la distinta reflexión de la luz por los distintos tejidos con respecto al brazo de referencia y representarla de forma gráfica mediante una escala de colores o grises.

La velocidad de oscilación del espejo de referencia limita la velocidad de la obtención de las imágenes; modificaciones en este parámetro han dado lugar al desarrollo de varios tipos de OCT [Murthy et al. 2016].

### ***Tipos***

Desde su descripción en 1991, la técnica de adquisición de imágenes por OCT ha ido evolucionando permitiendo cada vez una mayor resolución en el menor tiempo posible.

- **OCT de dominio temporal (T - OCT)** En ella, el espejo de referencia del interferómetro se mueve de forma mecánica para coincidir con el retraso de la reflexión de la muestra. La velocidad de oscilación del espejo de referencia limita la velocidad de la obtención de las imágenes y presenta varios inconvenientes [Murthy et al. 2016]:
  - Poca resolución (  $10 \mu$  de resolución axial).
  - Escasa correlación entre el escáner obtenido y el fondo de ojo del paciente.
  - Pobre densidad de muestreo; muchos datos son interpolados del análisis de un pequeño área de retina.
  
- **OCT de dominio tipo Fourier** (Figura 1.10)
  - *OCT de dominio espectral* (SD - OCT): En este tipo, el espejo de referencia se mantiene fijo, permitiendo una mayor velocidad de adquisición de las imágenes (entre 50 y 100 veces más rápida que la T - OCT) [Murthy et al. 2016] y eliminando los elementos mecánicos. Su velocidad de captura permite la realización de un mayor número de escáneres por lo que la resolución axial pasa a ser de entre  $4 - 7\mu$  mejorando la capacidad de discriminación de lesiones y permitiendo la posibilidad de crear imágenes en 3D. Este tipo de OCT presenta también un aumento de la densidad de píxeles de forma transversal por lo que mejora la visualización de la arquitectura retiniana. Instrumentos recientes presentan la tecnología conocida como *TruTrack*, que reduce significativamente la corrupción de la imagen debido a artefactos de movimiento y proporciona la oportunidad de correlacionar cuantitativamente las mismas áreas de la retina en estudios secuenciales [Murthy et al. 2016]. Este tipo de OCT emite una luz con una longitud de onda central de entre 800 - 870 nm, que permite una buena visualización de tejidos retinianos, pero disminuye su sensibilidad en tejidos más profundos [Waldstein et al. 2015].
    - \* *OCT de dominio espectral con enhanced depth imaging* (EDI - SD - OCT): Se basa en la colocación de forma intencional de un equipo de SD - OCT más cerca del ojo de lo que se hace en la práctica habitual. Con ello, acerca las estructuras

oculares profundas a la línea de «demora cero» que tiene la SD - OCT convencional permitiendo una mejor visualización de las mismas [Spaide et al. 2008; Miki et al. 2013].

- *OCT de tipo swept source* (SS - OCT): El SS - OCT utiliza una fuente de luz y detectores de barrido de frecuencia que miden la salida de interferencia como una función del tiempo en lugar de utilizar interferómetros como la SD - OCT convencional. La velocidad de barrido en estos instrumentos es el doble que la de la SD - OCT (100.000 A - scan / segundo en comparación con 50.000 A - scan / segundo), lo que permite una mayor rapidez en la adquisición de los escáneres. Este aumento de barrido, es lo que permite visualizar un campo considerablemente más amplio (12 mm frente a 6 - 9 mm en la SD - OCT) y una visualización tridimensional del vítreo, la retina y la coroides [Spaide et al. 2008].

\* *OCT de alta penetración*: Constituye un subtipo de SS - OCT que utiliza una fuente de luz de longitud de onda larga, de  $1 \mu$  (cerca de la luz infrarroja), que es menos vulnerable a la dispersión de la luz. Esta luz de longitud de onda más larga tiene la capacidad de penetrar más profundamente en los tejidos en comparación con la luz de onda corta utilizada en dispositivos SD - OCT convencionales [Miki et al. 2013].

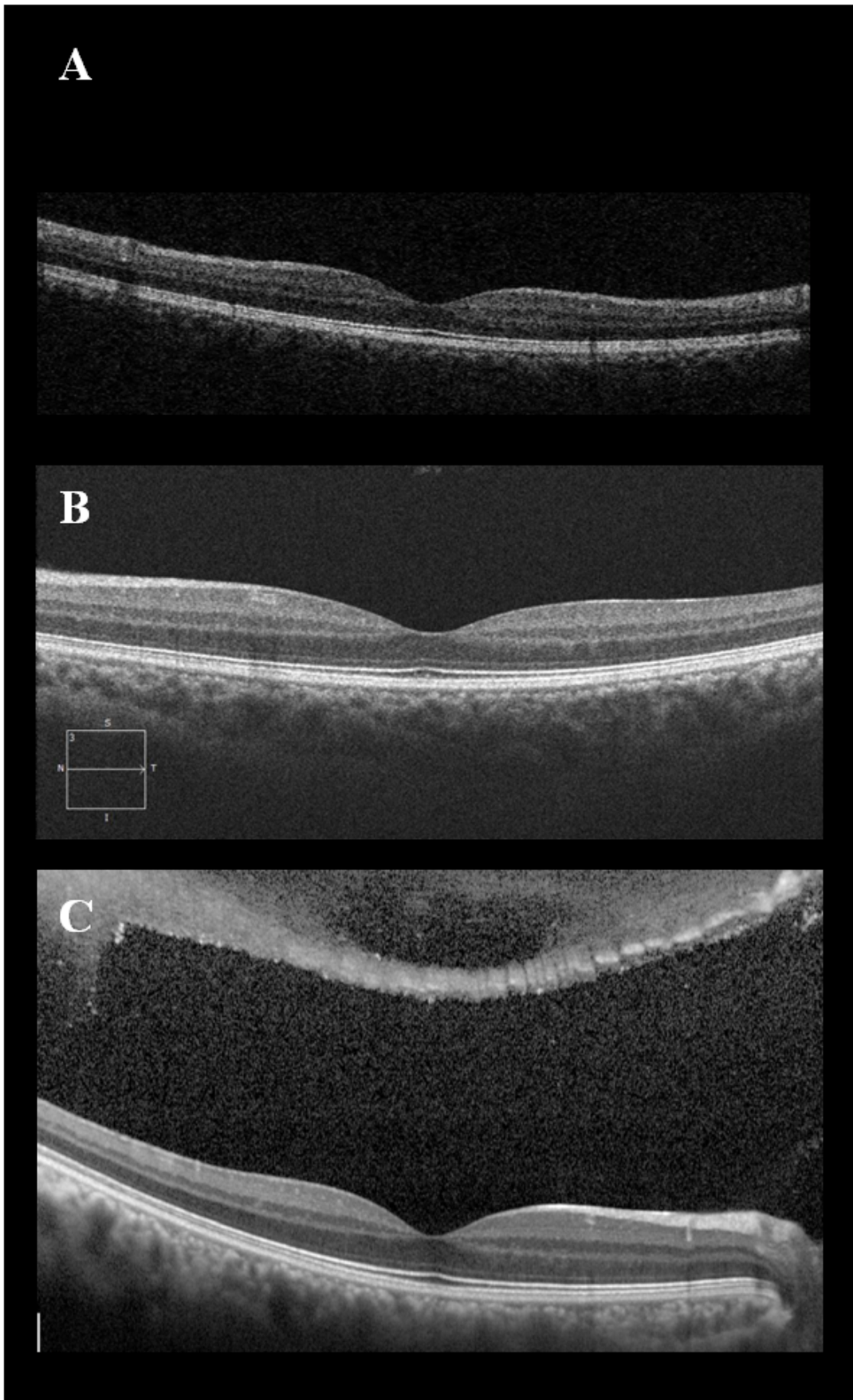
- **OCT polarizada (P - OCT)** Los sistemas descritos anteriormente toman medidas de la intensidad en las reflexiones, que permiten detectar distintos elementos y capas en la muestra. Los sistemas sensibles a la polarización no sólo miden esa intensidad en las reflexiones sino que además miden diferencias en la polarización entre las distintas reflexiones [Sayegh et al. 2014].

Estos equipos de OCT pueden emitir la luz desde una cámara flash de fondo de ojo convencional o utilizando un láser de barrido.

### *Correlación histológica con OCT*

En el escáner de la retina obtenido mediante OCT pueden distinguirse las distintas capas de la retina basándose en las propiedades ópticas de reflectividad que presenta cada una de ellas.

- Reflectividad alta: Capa de fibras nerviosas, MLE, capas de fotorreceptores y EPR.

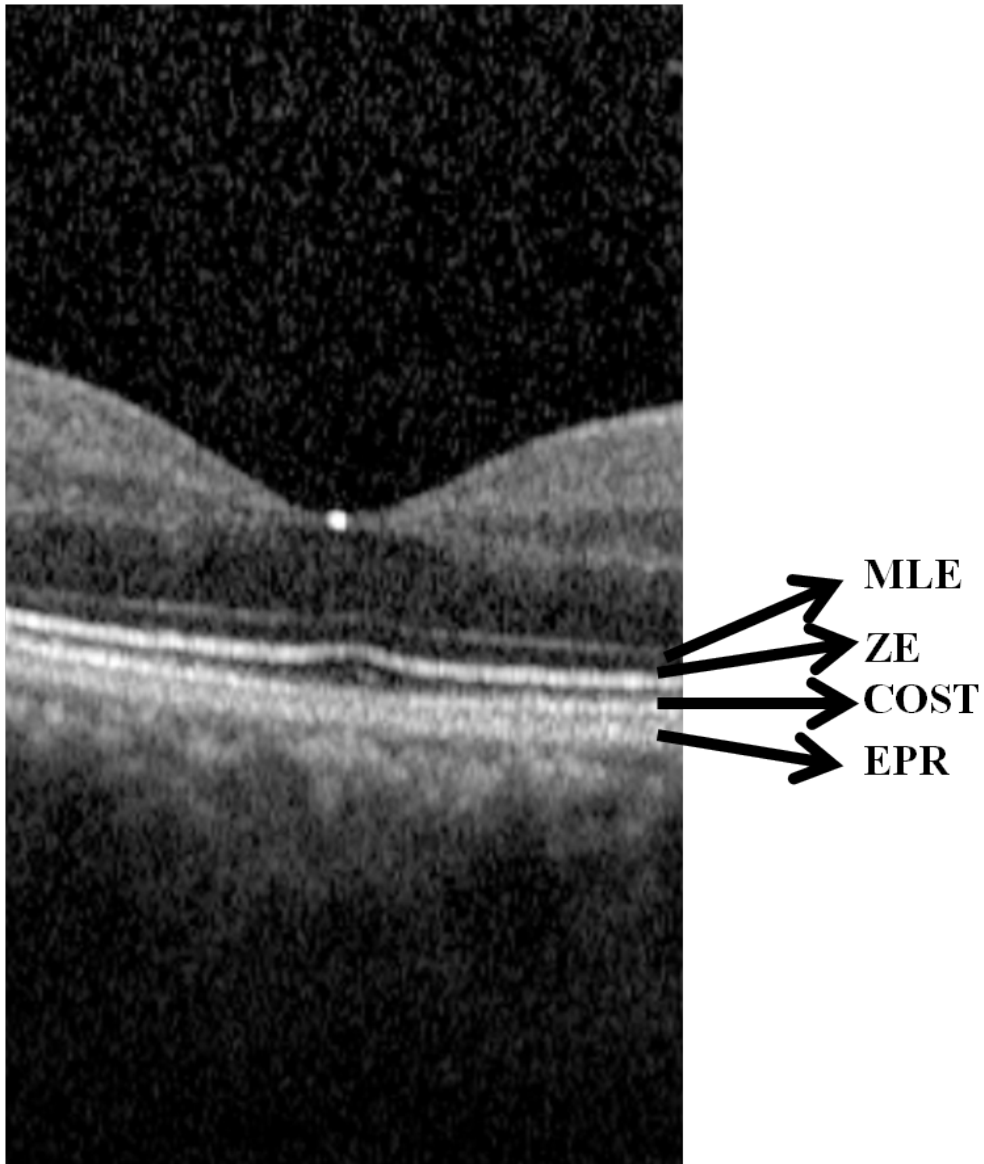


**Figura 1.10:** Imágenes de OCT de tipo Fourier centrados en fovea. Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia.” (A) SD - OCT (3D OCT - 2000, TopCon), (B) EDI - SD - OCT ( Cirrus HD OCT Model 4000, Carl Zeiss) y (C) SD - OCT (Spectralis, Heidelberg Engineering).

- Reflectividad media: Capa de células ganglionares, capa plexiforme interna y externa.
- Reflectividad baja: Capa nuclear interna y externa.

El empleo de SD - OCT ha permitido una visualización sin precedentes de la microestructura de la retina. Históricamente, en los scáneres obtenidos mediante T - OCT se obtenía poca visualización de las capas externas de la retina. Un análisis comparativo entre la histología retiniana conocida junto con la reflectancia obtenida mediante SD - OCT de las capas externas de la retina propone que las 4 líneas hiperreflectivas que aparecen en la retina externa se correlacionen con distintas estructuras anatómicas. Desde la parte interna a la externa son [Spaide et al. 2011] (Figura 1.11):

- **1 línea hiperreflectiva - MLE:** Parece corresponderse con los complejos de unión de las células de Müller que conforman la MLE. Es posible que la anchura de la banda se deba a las microvellosidades de las células de Müller.
- **2 línea hiperreflectiva - Línea o zona elipsoide (ZE):** Esta línea se pensaba que representaba la zona de unión entre los SI y los SE (en inglés «*Inner Segment*» y «*Outer Segment*») de los fotorreceptores recibiendo el nombre de línea IS/OS. Sin embargo, el análisis de sus características reflectivas parece indicar que realmente se debe a la porción elipsoide de los SI de los fotorreceptores, pues la mayoría de su reflectividad viene determinada por el gran número de mitocondrias existente en dicha localización.
- **3 línea hiperreflectiva - Línea «*Cone Outer Segment Tip*» COST:** En lugar de corresponderse con la membrana de Verhoeff, esta línea representa el contacto cilíndrico que se produce entre la superficie apical de las células del EPR con la porción externa de los SE de los conos.
- **4 línea hiperreflectiva - EPR:** Se atribuye su presencia a los dos tercios internos de las células del EPR donde se localizan principalmente los melanosomas. Tanto la membrana de Bruch como la coriocapilar pueden contribuir, en ocasiones, a un aumento del grosor de la misma.



**Figura 1.11:** Líneas hiperreflectivas de retina externa en SD - OCT. Fuente: "Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia."

### 1.3.4 Angiografía con fluoresceína

La angiografía fluoresceínica (AGF) es una técnica diagnóstica que se basa en la realización de imágenes de forma secuencial tras la administración previa de un colorante endovenoso; la fluoresceína sódica. Esta exploración permite detectar alteraciones en el flujo vascular propias de determinadas enfermedades oculares sirviendo de herramienta diagnóstica para las mismas.

Para su interpretación es necesario conocer las propiedades de luminiscencia, físicas y químicas de la fluoresceína, las características de la vascularización de los tejidos oculares y las características del angiógrafo empleado.

#### *La fluoresceína sódica y los patrones de fluorescencia*

La fluoresceína sódica como colorante ha sido usado en medicina desde su síntesis en 1871 por Adolf von Baeyer; no obstante, su uso oftalmológico se desarrolla a partir de 1955 primero con la tinción de la superficie anterior ocular y, posteriormente, con la evaluación de la circulación retino - coroidea [Nielsen 1986].

La fluoresceína sódica es un colorante de tipo hidrocarburo cristalino que absorbe la luz cuando es expuesto a longitudes de onda en el rango azul (465 - 490 nm), dando lugar a una luz de excitación en las frecuencias verde - amarillo (520 - 530 nm). Estas longitudes de onda de emisión y excitación se encuentran dentro del espectro de luz visible lo que permite que con el empleo de filtros adecuados y un sistema fotográfico estándar sea posible visualizar la fluorescencia [Wolfe 1986].

Dentro de sus características físico - químicas destaca el hecho de ser un colorante soluble en agua, con bajo peso molecular y una fluorescencia máxima próxima al pH de la sangre. Circula predominantemente unido a proteínas, por lo que el porcentaje de fluoresceína sódica libre circulante susceptible de ser estimulada es pequeño. No obstante, su peso molecular le impide traspasar, en condiciones normales, las estrechas uniones de las células endoteliales de los vasos retinianos (barrera hematorretiniana interna) y las uniones tipo zonula occludens de las células del EPR (barrera hematorretiniana externa) dando una imagen de la circulación retiniana y coroidea y de las posibles alteraciones de la permeabilidad que puedan acontecer [Wolfe 1986].

Para interpretar la angiografía con fluoresceína hay que tener en cuenta que en el fondo de ojo encontramos la circulación retiniana y, separada de ella por la monocapa de células del EPR, la circulación coroidea. El grado de pigmentación del EPR y los cambios patológicos en esta capa

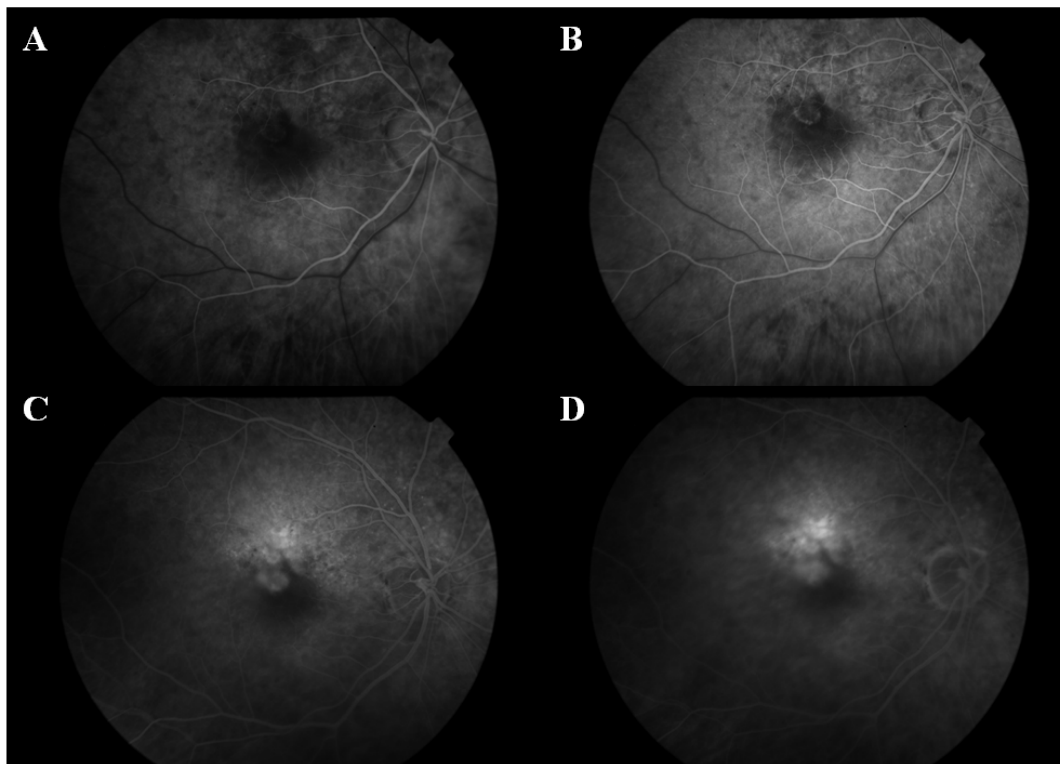
influyen en la apariencia angiográfica coroidea. En función del tiempo tras la administración del colorante y de la llegada del mismo a los diferentes vasos, se han descrito diferentes fases en el angiograma útiles para su interpretación. Así mismo, determinadas alteraciones en la anatomía retino - coroidea pueden producir modificaciones en el patrón de fluorescencia (Figura 1.12).

**Fases del angiograma:**

- Coroidea o pre - arterial (6 - 8 segundos): La fluoresceína llega a la circulación coroidea por las arterias ciliares posteriores y alcanza la coriocapilar que se rellena en forma de parches irregulares por extravasación del colorante desde las fenestraciones coroideas. El EPR y sus estrechas uniones intercelulares actúan como barrera impidiendo que el colorante difunda hacia las capas externas de la retina.
- Arterial (8 - 12 segundos): Se observa el llenado de las arterias y la continuación del llenado coroideo.
- Arteriovenosa o capilar (13 segundos): Muestra el llenado completo de las arterias y de los capilares.
- Venosa: Se puede subdividir en (1) venosa precoz (30 segundos), (2) venosa media (2 - 4 minutos) y (3) venosa tardía (más de 5 minutos). En la fase precoz, una vez se han llenado las arterias y capilares retinianos, se visualiza el flujo venoso laminar marcado con tinción del colorante en la pared venosa. A medida que avanza el angiograma se observa el llenado venoso completo con una concentración reducida de contraste en las arterias. En fases tardías desaparece el colorante tanto de la circulación arterial como venosa, siendo más visibles las lesiones hiperfluorescentes.

**Patrones angiográficos:**

- Hiperfluorescencia: Puede ser resultado de (1) la presencia anormal de la fluoresceína en un lugar donde no se encuentra en condiciones normales, (2) una concentración mayor de lo normal de fluoresceína, o (3) un aumento de la transmisión de la fluorescencia por a una condición patológica suprayacente.
- Hipofluorescencia: Se produce debido a (1) la ausencia completa de fluoresceína en un área donde normalmente debería haber llegado el colorante, (2) una disminución relativa de la concentración normal de fluoresceína en un área particular, o (3) un bloqueo



**Figura 1.12: Imagen de AGF de una NVC tipo 2 secundaria a DMAE).** Fuente: “ Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia.” (A) Fase arteriovenosa, (B) fase venosa precoz, (C) fase venosa media, (D) fase venosa tardía.

de la transmisión de la fluorescencia normal de secundaria a una condición patológica suprayacente.

### *Equipos angiográficos*

La grabación permanente de una angiografía con fluoresceína es posible gracias al desarrollo de sistemas de vídeo especiales y cámaras de fondo de ojo capaces de realizar una fotografía secuencial rápida. Dentro de los equipos angiográficos encontramos:

- **Cámara de fondo convencional:** Se emplea un filtro de excitación para crear una banda estrecha de longitudes de onda azules. La fluoresceína excitada dentro de los vasos y los espacios extracelulares, emite luz fluorescente de color amarillo - verde, que se registra en la película fotográfica. Para evitar que la luz reflejada por otras estructuras oculares llegue a la película fotográfica, se emplean filtros que únicamente permiten el paso de la luz en la longitud de onda amarillo - verde.

- **Oftalmoscopia con láser de barrido confocal:** Presenta determinadas ventajas con respecto a las cámaras convencionales. Por un lado, es capaz de generar la longitud de onda pico que produce la máxima fluorescencia del colorante mejorando la calidad de las imágenes. Mediante el empleo de un agujero estenopeico disminuye la cantidad de luz reflejada; permitiendo una mayor resolución y que puedan visualizarse con mayor detalle pequeños vasos [Hassenstein et al. 2009]. Además el empleo de luz tipo láser aumenta la velocidad de adquisición de las imágenes pudiendo crear registros dinámicos de las mismas y mejora el cumplimiento del paciente al producir menos deslumbramiento [Hassenstein et al. 2009].

### 1.3.5 Angiografía con verde de indocianina

De forma similar a la AGF, esta técnica diagnóstica también se basa en la realización de imágenes de forma secuencial tras la administración de un colorante endovenoso. La diferencia principal radica en que el colorante empleado es el verde de indocianina el cual permite una mayor visualización de la vascularización coroidea.

En general, la angiografía con verde de indocianina (AVI) se suele hacer de forma conjunta con la AGF, pues ambas pruebas aportan información del estado del árbol vascular y de posibles alteraciones de la permeabilidad. Además de en la DMAE, el verde de indocianina se realiza cuando se requiere una evaluación coroidea detallada como puede ser en patología oncológica, coroidopatías inflamatorias o degenerativas o en los estudios del flujo coroideo [Stanga et al. 2003].

#### *El verde de indocianina y los patrones de cianescencia*

El verde de indocianina tiene un pico de absorción entre 790 - 805 nm y de emisión en 835 nm, dentro del espectro del infrarrojo. Estas propiedades lumínicas permiten una mayor visualización de la vascularización coroidea, la cual puede ser visible incluso con la presencia de sangre en las capas retinianas [Stanga et al. 2003]. Además el verde de indocianina tiene un peso molecular mayor que la fluoresceína y se une en un 98 % a proteínas plasmáticas lo que disminuye su extravasación por las fenestraciones de la coriocapilar e incrementa la visualización del árbol circulatorio coroideo [Fernandes et al. 2002; Fox et al. 1960; Stanga et al. 2003]

**Fases del angiograma:** Al igual que sucede en la AGF, es posible diferenciar distintas fases en el AVI en función del tiempo tras la inyección del colorante.

- **Precoz (0 - 3 minutos):** Tras la inyección del verde de indocianina, éste alcanza los grandes vasos coroideos arteriales y venosos y la circulación retiniana. Los vasos individuales de la coriocapilar no pueden visualizarse debido a un menor flujo sanguíneo en los mismos.
- **Media (5 - 15 minutos):** En torno a los 5 minutos tras la inyección del colorante empieza a objetivarse una hipercianescencia difusa coroidea. Es en esta fase cuando las lesiones típicamente hipercianescentes comienzan a visualizarse.
- **Tardía (18 - 22 minutos):** La hipercianescencia del árbol vascular coroideo y retiniano desaparece, visualizándose los vasos coroideos como canales hipocianescentes. No obstante, las lesiones hipercianescentes son más fácilmente visualizables al presentar máximo contraste sobre un fondo oscuro.

**Patrones de cianescencia:** Una de las ventajas del empleo del verde de indocianina es su capacidad de producir fluorescencia a través de pigmentos, lípidos, lípidos o hemorragias mejor que el colorante de fluoresceína. No obstante, los patrones de cianescencia (como se llama la fluorescencia en el caso del uso de verde de indocianina) son similares a los encontrados con la fluoresceína sódica.

- **Hipercianescencia:** Resultado de la presencia de verde de indocianina mayor a lo habitual, más visible o en un sitio diferente a las condiciones normales. Generalmente se habla de dos tipos de hipercianescencia.
  - **Placa:** Cualquier área de hipercianescencia anormal objetivable en fases medias y tardías del angiograma y mayor de un área de disco de diámetro máximo.
  - **Punto caliente:** Cualquier área de hipercianescencia anormal objetivable en fases medias y tardías del angiograma menor de un área de disco de diámetro máximo.
- **Hipocianescencia:** Por ausencia total o parcial de colorante o una dificultad en la visualización del mismo.

### *Equipos angiográficos*

Dado que el verde de indocianina emite dentro del espectro del infrarrojo, para la detección de su luminiscencia es necesario el empleo de filtros y cámaras modificadas para dicha longitud de onda. De forma similar a la AGF pueden usarse equipos basados en las cámaras de ojos convencionales o en el empleo de equipos de oftalmoscopia con láser de barrido confocal (Figura 1.13).

### **1.3.6 Autofluorescencia**

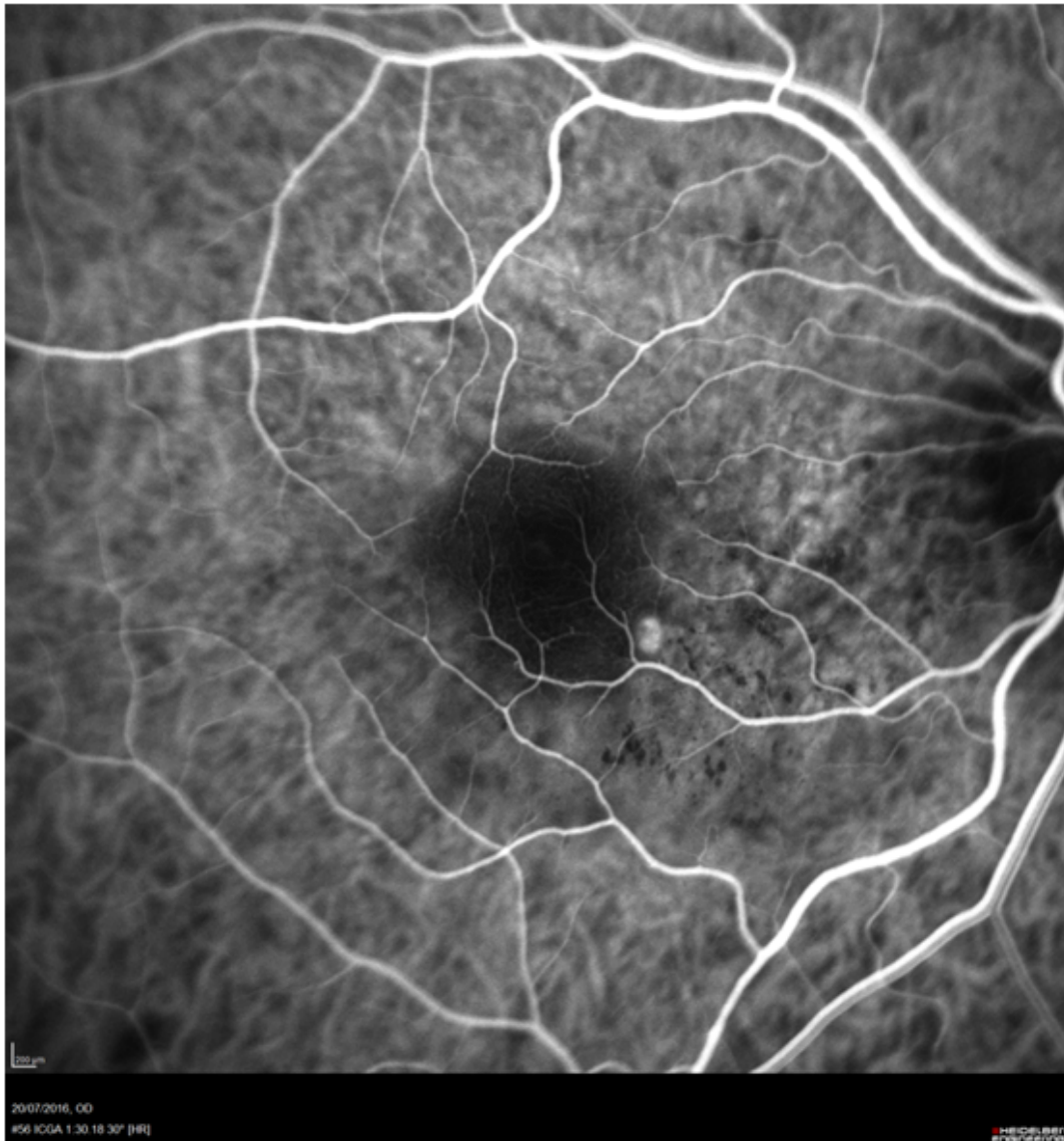
La autofluorescencia (AF) es un método de imagen que, basándose en la capacidad intrínseca del fondo de ojo de producir fluorescencia, permite hacer una cartografía de la distribución de lipofuscina en la monocapa de células del EPR, así como de otros fluoróforos que pueden aparecer en la retina externa o en el espacio subretiniano [Schmitz-Valckenberg et al. 2008].

Es una técnica inocua, no invasiva que permite el diagnóstico de muchas patologías retinianas.

### *La lipofuscina y los patrones de autofluorescencia*

El EPR se encarga de la reutilización de los componentes moleculares del ciclo visual así como de fagocitar los discos de los SE de los conos y los bastones. En condiciones normales, las células del EPR van eliminando los productos de desecho hacia la circulación coroidea. Sin embargo, con el paso del tiempo, se acumulan materiales de desecho de estos procesos en el interior de las células del EPR formando gránulos de lipofuscina. La lipofuscina posee una estructura molecular compleja integrada principalmente por fluorocromos, que cuando son estimulados con luz de baja longitud de onda, son capaces de emitir luz de entre 480 - 800 nm, con una AF máxima entre 600 - 640 nm [Schmitz-Valckenberg et al. 2008].

El análisis de la distribución de lipofuscina nos puede dar una idea indirecta del funcionamiento del EPR y los fotorreceptores. Su acúmulo en el EPR depende del proceso de renovación de los SE y se ve afectada si se produce un desequilibrio entre la producción de los productos de desecho y la eliminación de los mismos. Una disfunción del EPR por incapacidad para eliminar los desechos puede dar un acúmulo de lipofuscina, mientras que la pérdida de fotorreceptores o de células del EPR puede producir una disminución de la misma. Es conveniente tener en cuenta que existen otros componentes en el fondo de ojo que nos pueden modificar el patrón de autofluorescencia. Por ejemplo, los pigmentos de luteína y zeaxantina presentes en el área



**Figura 1.13:** Imagen de AVI de láser de barrido confocal (Spectralis, Heidelberg Engineering) en fase media en una vasculopatía polipoidea (VCP). Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia”.

macular atenúan la luz emitida para estimular la lipofucsina haciendo que la autofluorescencia sea menor en el área macular [Kellner et al. 2010]. Además, la presencia de sangre o lípidos que impidan que la luz llegue al EPR también van a producir imágenes hipoautofluorescentes.

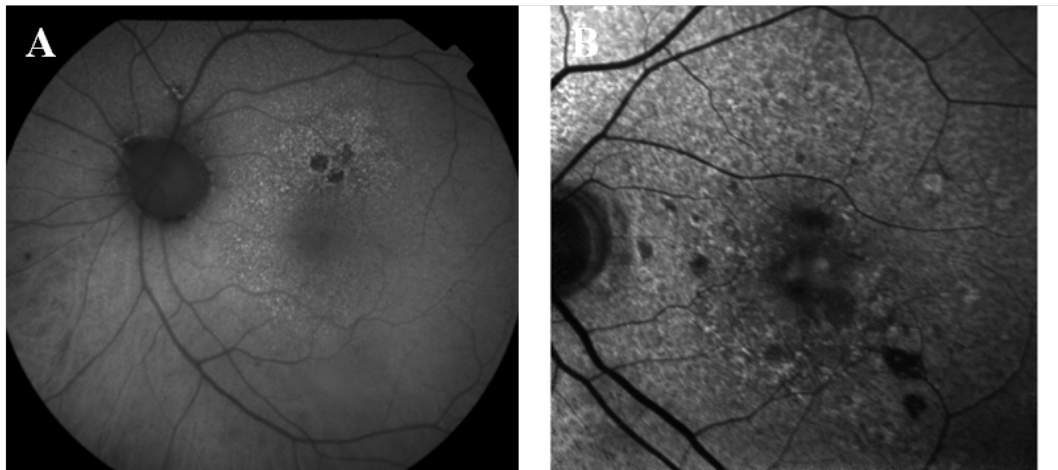
### ***Tipos y equipos de autofluorescencia (AF)***

En función de la longitud de onda empleada es posible diferenciar distintos tipos de AF:

- **Autofluorescencia de onda corta:** Es el tipo de AF más frecuentemente empleado y el descrito con detalle anteriormente. No obstante, este tipo de autofluorescencia puede presentar limitaciones en la detección del margen del área de atrofia geográfica sobre todo en presencia de cataratas o cuando estos márgenes se localizan cerca del área foveal pues los pigmentos xantófilos presentes en el área macular pueden bloquear la autofluorescencia [Kellner et al. 2010].
- **Autofluorescencia cercana al infrarrojo:** Constituye un nuevo tipo de AF que se ha creado para intentar suplir las limitaciones de la autofluorescencia de onda corta en el área macular. Esta técnica, que emite en longitudes de onda de 787 nm y recoge la excitación mayor de 800 nm, permite visualizar la melanina, un fluoróforo presente en las células del EPR y de la coroides [Kellner et al. 2010]. Con la AF convencional muchas veces es difícil diferenciar si las zonas hipoautofluorescentes se deben a atrofia franca del EPR o a la presencia de otros compuestos como las drusas. La autofluorescencia cercana al infrarrojo permite delimitar con mayor fiabilidad las zonas de atrofia macular .

Se han desarrollado diferentes equipos de AF que se emplean en la práctica clínica habitual. Entre ellos encontramos (Figura 1.14):

- **Espectrofotómetro de fondo de ojo:** Diseñado por Delori en 1994, para medir la excitación y emisión espectros de la autofluorescencia de pequeñas áreas de la retina (2 diámetros de papila) [Schmitz-Valckenberg et al. 2008].
- **Cámara de fondo convencional:** Emite una luz con una baja longitud de onda que estimula toda la retina por completo. Para disminuir el artefacto de la imagen producido por la autofluorescencia del cristalino, se han diseñado equipos que emiten luz entre 535 - 580 nm y utilizan filtros de barrera para luz entre 615 - 715 nm [Schmitz-Valckenberg et al. 2008].



**Figura 1.14: Patrones de atrofia inicial del EPR en AF .** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia”. (A) Imagen de cámara convencional (50<sup>o</sup> TRC - 50IX Retinal Camera, Topcon Medical Systems), (B) Imagen con oftalmoscopia con láser de barrido (Spectralis, Heidelberg Engineering)

- **Oftalmoscopia con láser de barrido confocal:** Este equipo láser emite a una longitud de onda 488 nm y un filtro de barrera de 500 nm. Mejora el contraste, disminuye el ruido de la imagen y proporciona mejor resolución de las imágenes. A diferencia del espectrofotómetro, en una sola imagen es posible valorar grandes áreas de retina [Batioglu et al. 2015].

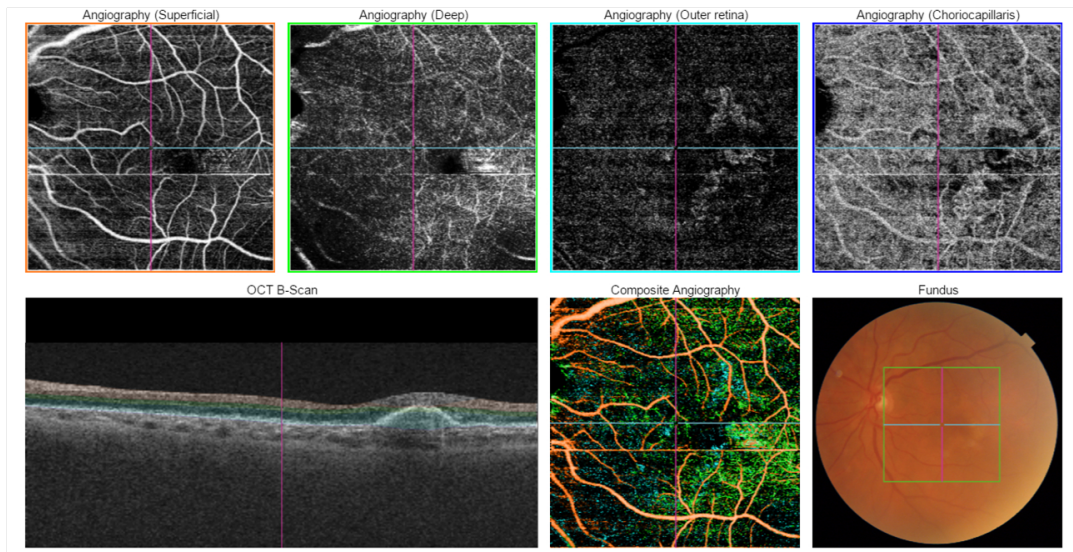
### 1.3.7 Tomografía de coherencia óptica con angiografía

La angio - OCT es una nueva técnica no invasiva que basándose en los principios de OCT nos proporciona una imagen estructural junto con información de la circulación retiniana y coroidea sin la necesidad de la inyección de colorante. Esta técnica se basa en que el ojo es un tejido estático en el que las únicas estructuras en movimientos lo constituye el torrente sanguíneo [Coscas et al. 2015b]. Analizando cambios en la intensidad o en la fase de la señal de OCT es posible discriminar los complejos vasculares.

#### *Tipos y equipos de angio - OCT*

Se han descrito varios subtipos en función de las estrategias y algoritmos diseñados para la toma de la imagen dinámica [Chalam et al. 2016; Zhang et al. 2015]. Dentro de ellos encontramos:

- **Angiografía basada en la intensidad de la señal de OCT:** Se basa en detectar el movimiento dentro del lumen de los vasos sanguíneos mediante la medición de la variación de la amplitud de señal de OCT reflejada entre escáneres consecutivos [Jia et al. 2014].



**Figura 1.15:** Imagen del área macular con SS - angio - OCT. Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia”.

Subtipos frecuentemente utilizados de esta técnica pues disminuyen el ruido de fondo son el *Split - spectrum amplitude - decorrelation angiography with optical coherence tomography* (SSADA) o angio - OCT con decorrelación de la amplitud de espectro dividido y el *Swept source angio - OCT* (SS - angio - OCT) (Figura 1.15).

- **Angiografía basada en la fase de la señal de OCT:** Se basa en la técnica tipo Doppler. Detecta el flujo sanguíneo mediante la medida de las diferentes fases en líneas adyacentes [Fingler et al. 2009].
- **Angiografía basada en el complejo de la señal de OCT:** Combina la estrategia de intensidad y la de fase para la detección del movimiento. Dentro de ella encontramos la OCT migroangiografía (OMAG) y la angio - OCT con decomposición Eigen (ED - OCTA) [Zhang et al. 2015].

## 1.4 La degeneración macular asociada a la edad

### 1.4.1 Concepto

La DMAE constituye un proceso retiniano degenerativo crónico que afecta al área macular, y acontece generalmente en personas mayores de 65 años [Bird et al. 1995]. En líneas generales, la DMAE se diferencia en un estadio inicial (también llamado maculopatía asociada a la edad

y en un estadio avanzado que recibe propiamente el nombre de DMAE que puede cursar o bien de forma seca con el desarrollo de atrofia geográfica o de forma húmeda o exudativa con el desarrollo de neovascularización. Aunque se han descrito diversos factores de riesgo asociados, todos los estudios demuestran que la prevalencia, incidencia y progresión de todas las formas de DMAE aumentan gradualmente conforme aumenta la edad.

### 1.4.2 Clasificación

A lo largo de los años se ha intentado encontrar el sistema de clasificación ideal para la DMAE; no obstante, el creciente y progresivo conocimiento sobre esta enfermedad ha dificultado este proceso.

En 1991 la “*Clasificación de Wisconsin*” [Klein et al. 1991] y, posteriormente, en 1995 el “*El grupo internacional de estudio epidemiológico de la maculopatía asociada a la edad*” [Ozko et al. 2016] objetivaron la diversidad en conceptos y establecieron unos criterios en base a hallazgos objetivados en retinografías de fondo de ojo para el diagnóstico consensuado de esta enfermedad.

La clasificación internacional consideraba que había dos tipos o estadios de enfermedad: (1) la forma inicial también llamada maculopatía asociada a la edad (MAE), caracterizada por la presencia de drusas blandas y alteraciones pigmentarias; y (2) la forma avanzada o DMAE que podía ser tanto (2a) seca, presentando un estadio final de atrofia geográfica como (2b) húmeda con el desarrollo de neovascularización subretiniana. Dentro de los parámetros que utilizaban para la gradación se encontraban el tipo, tamaño y localización de las drusas y de las zonas de cambios pigmentarios del EPR [Ozko et al. 2016] (Figura 1.1).

En 2005, el grupo del “*Age-Related Eye Disease Study*” (AREDS) [Davis et al. 2005] usando gradaciones de fotografías estereoscópicas en color de fondo de ojo (tomadas al inicio, al año 3 y anualmente hasta los 5 años) de más de 3000 pacientes propusieron un nuevo sistema de clasificación. Describieron una escala de gravedad de 9 pasos que establecía el riesgo a 5 años de evolución hacia estadios avanzados de DMAE en cada uno de los ojos en pacientes con ausencia de DMAE avanzada inicial.

Dentro de los puntos que analizaban destacan:

- Características de las drusas: Tipo, tamaño o área.
- Alteración pigmentarias: Aumento de pigmentación, depigmentación o atrofia geográfica.

Clasificación de DMAE	Definición (Lesiones objetivadas en alguno de los ojos dentro de undiámetro de 2 áreas de disco central en la fóvea)
Cambios de envejecimiento normales, no patológicos	Sólo drusas de pequeño tamaño ( $\leq 63 \mu$ ) y No alteraciones pigmentarias
MAE	Drusas de tamaño medio ( $> 63 \mu$ y $\leq 125 \mu$ ) Y No alteraciones pigmentarias*
	Drusas de tamaño grande ( $> 125 \mu$ ) y/o Alteraciones pigmentarias*
DMAE	DMAE exudativa y/o Atrofia geográfica
*Alteraciones pigmentarias: Cualquier área con alteraciones hipo o hiperpigmentarias asociadas a drusas de tamaño medio o grande, no en relación con otras enfermedades diferentes a la DMAE.	

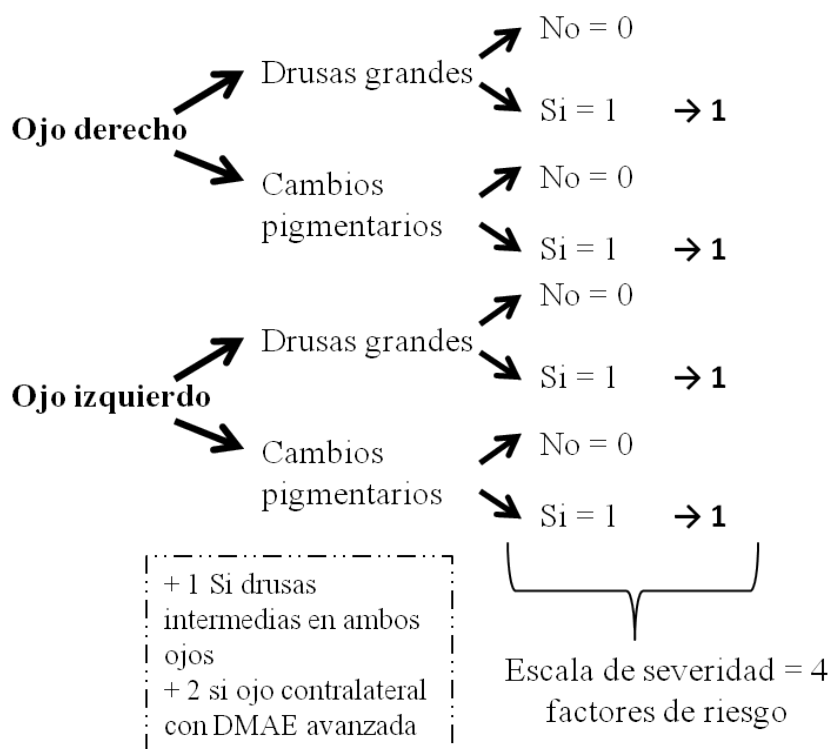
**Tabla 1.1: Clasificación internacional de la DMAE.** Fuente: “*An International Classification and Grading System for Age - related Maculopathy and Age - related Macular Degeneration.*”; El grupo internacional de estudio epidemiológico de la maculopatía asociada a la edad [Bird et al. 1995].

- Alteraciones características de DMAE exudativa: Desprendimientos del EPR, desprendimientos neurosensoriales, hemorragias subretinianas o tejido fibroso subretiniano.

Consideraban DMAE avanzada la presencia de al menos 1 de las características de DMAE neovascular, el haber requerido fotocoagulación láser para la DMAE o la presencia de atrofia geográfica foveal.

En relación con el riesgo de progresión esta escala simplificada asignaba 1 punto si el paciente presentaba drusas grandes (mayores de  $125 \mu$ ) o cambios pigmentarios en alguno de los ojos o si tenía drusas de tamaño intermedio (entre  $63 - 125 \mu$ ) bilaterales en ausencia de drusas grandes. En pacientes ya con DMAE avanzada en un ojo, esta escala serviría para establecer el riesgo de progresión a 5 años en el ojo adelfo partiendo de una puntuación basal de 2. Según esta escala el riesgo a 5 años se incrementaría: 0 factores, 0.5%; 1 factor, 3%; 2 factores, 12%; 3 factores, 25%; y 4 factores, 50% [Ferris et al. 2005].

La fiabilidad de esta escala, ha quedado demostrada recientemente. El grupo de Liew y colaboradores [Liew et al. 2016] ha evaluado su utilidad tanto en pacientes incluidos en estudios clínicos como en pacientes de la práctica clínica habitual con un seguimiento a 5 y a 10 años. Según este grupo el riesgo a 10 años sería 0 factores, 0.7% - 1.5%; 1 factor, 7.3% - 8.4%; 2 factores, 27.6% - 36.6%; 3 factores, 20% - 52.7%; y 4 factores, 71.4% - 75% (Figura 1.16).



**Figura 1.16: Factores de riesgo para el desarrollo de DMAE avanzada.** Fuente: Figura basada en “Age-Related Eye Disease Study (AREDS).”; El grupo de estudio de la enfermedad ocular asociada a la edad. [Ferris et al. 2005].

Con los años, el conocimiento sobre la DMAE fue aumentando y surgieron alternativas terapéuticas principalmente para las formas sintomáticas. En 2013 Ferris y colaboradores [Ferris et al. 2013] desarrollaron una nueva clasificación clínica de la enfermedad que dejaba a un lado los estadios más iniciales de la enfermedad y se centraba en realizar una clara diferenciación de aquellos estadios predisponentes al desarrollo de complicaciones que pudieran llegar a afectar a la visión (Figura 1.2).

Esta clasificación fenotípica es de las más frecuentemente empleadas en la clínica habitual. No obstante, el desarrollo de nuevas clasificaciones que tuvieran en cuenta factores genéticos y de hábitos de vida o hallazgos con nuevos métodos de imagen como las pseudodrusas reticulares que parecen también tener repercusión pronóstica [Khan et al. 2016] pueden ser de gran interés.

<b>Clasificación de DMAE</b>	<b>Definición</b> (Lesiones objetivadas en alguno de los ojos dentro de un diámetro de 2 áreas de disco central en la fovea)
No cambios de envejecimiento	No drusas y No alteraciones pigmentarias*
Cambios de envejecimiento normales, no patológicos	Sólo drusas de pequeño tamaño ( $\leq 63 \mu$ ) y No alteraciones pigmentarias
DMAE precoz	Drusas de tamaño medio ( $> 63 \mu$ y $\leq 125 \mu$ ) Y No alteraciones pigmentarias*
DMAE intermedia	Drusas de tamaño grande ( $> 125 \mu$ ) y/o Alteraciones pigmentarias*
DMAE avanzada	DMAE exudativa y/o Atrofia geográfica
*Alteraciones pigmentarias: Cualquier área con alteraciones hipo o hiperpigmentarias asociadas a drusas de tamaño medio o grande, no en relación con otras enfermedades diferentes a la DMAE.	

**Tabla 1.2: Clasificación de la DMAE desarrollada por Ferris y colaboradores en 2013.** Fuente: Tabla basada en “*Clinical Classification of Age-related Macular Degeneration*”; Ferris y colaboradores [Ferris et al. 2013].

A modo de resumen, en la actualidad podríamos decir que podemos diferenciar la DMAE inicial, intermedia y avanzada. La DMAE inicial o intermedia (también conocidas como DMAE seca) se caracteriza por la presencia de drusas, alteraciones pigmentarias y mínimos síntomas visuales. La DMAE avanzada puede ser dos formas; la forma conocida como atrofia geográfica (DMAE seca avanzada) que cursa con el crecimiento progresivo de áreas de atrofia en la región macular; y la DMAE neovascular (DMAE húmeda) en la que se desarrolla neovascularización coroidea [Kanagasingam et al. 2014].

### 1.4.3 Epidemiología

La DMAE constituye el 8.7% de las causas de ceguera a nivel mundial y es la primera causa de ceguera en los países industrializados [Wong et al. 2014]. En España, la tasa de ceguera completa debida a la DMAE es baja ya que la visión periférica está conservada; sin embargo, su desarrollo en el área macular produce una gran pérdida de AV y constituye un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes [Mangione et al. 2001].

A lo largo de los años se han realizado numerosos estudios epidemiológicos sobre esta patología. A principios de la década de los noventa se realizaron los principales estudios epidemiológicos iniciales con respecto a la DMAE. El estudio «*Beaver Dam*» en Estados Unidos [Klein et al. 1992]; el estudio «*Blue Mountains*» en Australia [Mitchell et al. 1995] y el estudio «*Rotterdam*»

en los Países Bajos [Vingerling et al. 1995]. Estos estudios establecieron unas tasas de incidencia y prevalencia de la DMAE inicial y de la DMAE avanzada (Figura 1.3):

Referencia	Nombre de estudio	Nº pacientes	Rangos de edades	MAE o DMAE Precoz <sup>*, 1, 2</sup>	DMAE Avanzada <sup>*3</sup>
Klein et al, 1992.	<b>The Beaver Dam Study Eye</b>	4771	43-54	8.4	0.1
			55-64	13.8	0.6
			65-74	18.0	1.4
			75+	29.7	7.1
Vingerling, 1995.	<b>Rotterdam Study</b>	6251	55-64		0.2
			65-74		0.8
			75-84		3.7
			84+		11.0
Mitchell et al, 1995.	<b>The Blue Mountains Eye Study</b>	3654	49-54	1.3	0.0
			55-64	2.6	0.2
			65-74	8.5	0.7
			75-84	15.5	5.4
			85+	28.0	18.5

\* Prevalencias de la enfermedad en %.  
<sup>1</sup> DMAE precoz “The Beaver Dam Study”: Drusas duras diferenciadas con alteraciones pigmentarias.  
<sup>2</sup> DMAE precoz “The Blue Mountains Eye Study” and: Drusas blandas con alteraciones pigmentarias.  
<sup>3</sup> DMAE avanzada: DMAE neovascular o atrofia geográfica.

**Tabla 1.3: Principales estudios epidemiológicos en la DMAE.** Fuente: Tabla basada en tabla adjunta en “Prevalence of Age - related Maculopathy in Australia The Blue Mountains Eye Study”; Mitchell y colaboradores [Mitchell et al. 1995].

No obstante, se sabe que la DMAE es una enfermedad de distribución mundial cuyas tasas de incidencia varían según las diferentes regiones y poblaciones. Es más, diferentes estudios han sugerido una fuerte influencia de la raza y de la etnia en la prevalencia de la enfermedad. Según un metaanálisis reciente [Wong et al. 2014] basado en una revisión sistemática de la literatura sobre la prevalencia de la DMAE conforme a etnias, regiones y sexos se ha objetivado:

- Tasas globales de DMAE en cualquier estadio de 8.69 %, de DMAE precoz de 8.01 % y de DMAE avanzada de 0.37 %.
- Mayor prevalencia de DMAE en cualquier estadio en europeos frente a asiáticos (12.3 % frente a 7.4 %) y mayor prevalencia de DMAE precoz en europeos frente a asiáticos (11.2 % frente a 6.8 %).

- Mayor tasa de 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).
- No diferencias en prevalencia entre poblaciones asiáticas y africanas.
- Mayor tasa de prevalencia de atrofia geográfica en europeos (1.11%), que africanos (0.14%) y asiáticos (0.21%).
- No diferencias en prevalencia de DMAE exudativa entre poblaciones.

Además, en base a una estimación del crecimiento poblacional y del envejecimiento de la población mundial, consideran que la DMAE pasaría de afectar a 196 millones de personas en el año 2020 a 288 millones en el 2040.

Según lo anterior, la prevalencia de la DMAE parece estar muy vinculada a factores raciales. Sin embargo, no podemos olvidar que otros factores también pueden estar influyendo en esta incidencia. En enfermedades con diferente incidencia y prevalencia poblacional, la geo-epidemiología se considera una gran estrategia de evaluación. Esta técnica permite comparar los datos epidemiológicos en diferentes regiones geográficas y distintas poblaciones atendiendo no sólo a cambios raciales o étnicos sino identificando variaciones genéticas, medioambientales o socioeconómicas que pueden afectar al desarrollo de la enfermedad. Uno de sus puntos de apoyo consiste en evaluar estudios de incidencia en poblaciones emigrantes donde los factores ambientales y socioeconómicos son diferentes a su localidad natal. Este mismo año, Reibaldi y colaboradores [Reibaldi et al. 2016] han publicado un estudio geo-epidemiológico sobre la DMAE. Según este grupo, además de la influencia racial y de la edad, ya conocidas en la DMAE, existe una correlación con la latitud, la longitud y la exposición solar. Existe mayor incidencia en poblaciones lejanas al ecuador, entre el meridiano 10° este y 10° oeste y con menor tasa de exposición a luz solar. No obstante, en dicho estudio destaca la ausencia de datos de otros factores sociodemográficos como el hábito tabáquico, la obesidad o el estilo de vida que pudieran influenciar estos resultados.

El «Grupo de Estudio de Epidemiología Ocular Español» [Casaroli-Marano et al. 2011] llevó a cabo en 2011 un estudio para conocer la prevalencia de la en España. Tras analizar los datos de 2132 pacientes reclutados siguiendo la clasificación internacional de la DMAE objetivaron resultados similares a los estudios previamente descritos:



Figura 1.17: Personas mayores de 64 años en España. Fuente: “Instituto Nacional de Estadística”

- Prevalencia de MAE (DMAE precoz o intermedia) en España en individuos mayor o igual a 65 años de 10.3 %.
- Prevalencia de DMAE avanzada (atrofia geográfica o DMAE neovascular) en España en individuos mayor o igual a 65 años de 3.4 %.
- La prevalencia de DMAE avanzada aumenta del 1.3 % en individuos entre 65 y 74 años al 8.5 % en aquellos mayores de 80 años.
- La tasa de DMAE avanzada con atrofia geográfica se sitúa en 1.5 % y la de DMAE avanzada neovascular en 1.9 %

Según datos del «Instituto Nacional de Estadística», el envejecimiento progresivo de la población española sitúa en el año 2016 la tasa de personas mayores de 64 años en el 18.73 %. Esta tasa de envejecimiento es la mayor registrada en las historia de España y se ha objetivado un aumento progresivo de la misma en los últimos 10 años. En particular, la Comunidad Valenciana presenta un tasa de envejecimiento de valores intermedios con respecto al resto del territorio nacional (Figura 1.17). La población total censada a fecha 01/01/2016 es de 46.438.422. De entre ellos, 8.697.916 corresponde a personas mayores de 64 años. Esto hace que, en base a los datos de prevalencia anteriormente señalados, en la actualidad encontremos unas 895.885 personas con DMAE precoz o intermedia y 295.729 con DMAE avanzada en España.

### 1.4.4 Patogénesis y factores de riesgo

La DMAE es una enfermedad compleja, en la que se ven involucrados tanto factores genéticos como ambientales [Lambert et al. 2016]. Dentro de los factores de riesgo más corroborados en estudios clínicos para el desarrollo de la DMAE encontramos: la edad, la raza caucásica, el tabaquismo, la obesidad y la grasa de la dieta, los factores genéticos (Figura 1.4) y la historia familiar. Resultados contradictorios se han obtenido en cuanto a la influencia del sexo, el color del iris, la exposición solar, el consumo de alcohol y medicamentoso, su asociación con enfermedades cardiovasculares y sobre hábitos dietéticos [Rastogi et al. 2016]. No obstante, estudios como el AREDS han demostrado que el aporte de antioxidantes y de zinc puede reducir el riesgo de progresión de la DMAE. En el estudio original AREDS se demostró que los suplementos que contienen vitamina C, vitamina E, betacaroteno y zinc pueden reducir la probabilidad individual a 5 años de desarrollar DMAE avanzada en un 25 % [Chew et al. 2013]. El estudio AREDS - 2 fue diseñado para investigar más a fondo si la inclusión de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega - 3 y de luteína / zeaxantina en la formulación original podrían también reducir el riesgo de progresión. Aunque en un primer análisis de este estudio la adición de luteína y zeaxantina parecían no resultar beneficiosas, un segundo análisis mostró su eficacia al disminuir la progresión constituyendo una base de antioxidantes más segura que los betacarotenos inicialmente incluidos en el AREDS [Aronow et al. 2014]. La posible influencia de los ácidos grasos Omega 3 continúa siendo tema de estudio [Souied et al. 2015].

Genes con funciones retinianas específicas	Genes relacionados con el sistema inmune	Genes relacionados con la neovascularización	Genes relacionados con lipoproteínas	Polimorfismos genéticos que afectan a la terapia antiVEGF	Loci potencialmente relacionados con DMAE	
<ul style="list-style-type: none"> <li>•ABCA4</li> <li>•APOE</li> <li>•TIMP-3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Complemento:</li> <li>-CFH</li> <li>-CFHR1,</li> <li>CFHR3</li> <li>-CFB</li> <li>-CFD</li> <li>-C2, C3, C5</li> <li>•ARMS2/</li> <li>HTRA1</li> <li>•EFEMP1 (fibulin-3)</li> <li>•Hemicentin-1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•VEGF</li> <li>•TIMP-3</li> <li>•Fibulin-5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•LIPC</li> <li>•APOE</li> <li>•CETP</li> <li>•CD36</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•VEGF y VEGFR</li> <li>•CFH</li> <li>•C3</li> <li>•ARMS2/</li> <li>HTRA1</li> <li>•PLAG12A</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•ADAMTS9</li> <li>•Col8A1-</li> <li>FILIP1L</li> <li>•IER3-DDR1</li> <li>•SLC16A8</li> <li>•RAD51,</li> <li>RAD51B</li> <li>•FRK/Col10A1</li> <li>•CACNG3</li> <li>•MYRIP</li> <li>•Skiv2L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•IGFR1</li> <li>•REST-C4/F14-</li> <li>PolR2B-IGFBP7</li> <li>•SCARB1</li> <li>•SerpínG1</li> <li>•TNFRSF10A</li> <li>•CCL2</li> <li>•Cx3CR1</li> <li>•ERCC6</li> <li>•FSCN2</li> </ul>

**Tabla 1.4: Factores genéticos en la DMAE.** Fuente: Tabla basada “Risk factors and biomarkers of age - related macular degeneration”; Lambert y colaboradores [Lambert et al. 2016].

## **Patogénesis**

Con la edad, se producen cambios morfológicos en estructuras oculares como un aumento de productos de desecho en el EPR, 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 o una disminución del flujo y del calibre de los vasos de la coriocapilar [Ardeljan et al. 2013]. Sin embargo, no todos los ojos con el envejecimiento desarrollan DMAE. La influencia de determinados factores ambientales en sujetos con predisposición genética puede conllevar al desarrollo de una alteración del sistema inmunitario y a una inflamación crónica mantenida que hagan que, los cambios propios de la edad, se conviertan en sustrato para el desarrollo de la enfermedad [Ardeljan et al. 2013].

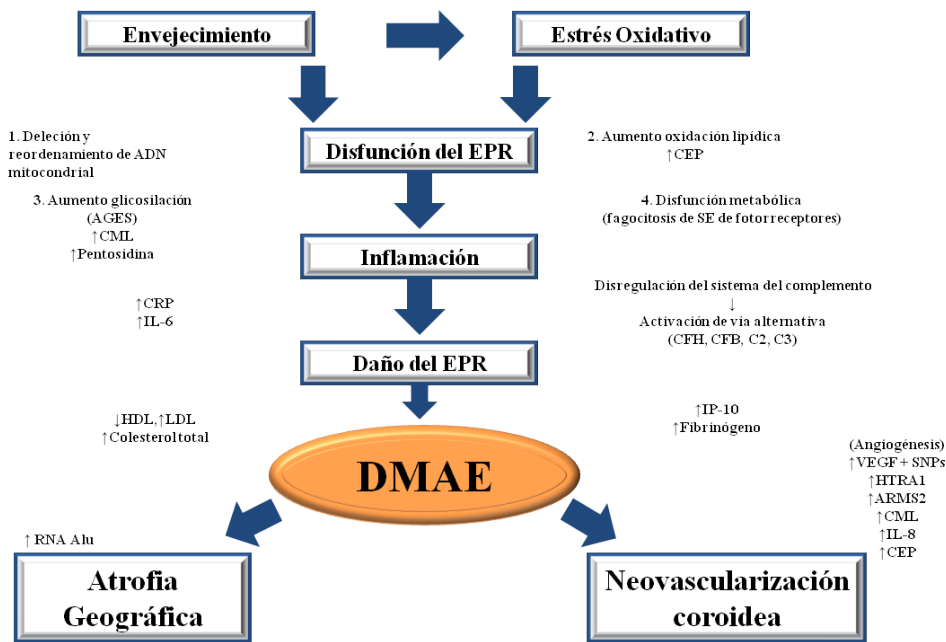
Además de las variaciones genéticas, recientes investigaciones combinando técnicas de metabolómica, proteómica, microARNs (miARNs) y marcadores séricos han facilitado el conocimiento de nuevos biomarcadores que constituyen nuevas herramientas para el cribado de la DMAE y para la monitorización de la misma.

- **Metabolómica:** El conocimiento de biomarcadores individuales plasmáticos puede ser de gran ayuda para la monitorización de la DMAE. A parte del análisis plasmático, también se pueden analizar estas sustancias en otros líquidos corporales como el humor vítreo [Barba et al. 2010]. En el campo de la DMAE destaca la identificación de la presencia de la neuroprotectina D1 en pacientes con la enfermedad [Bazan et al. 2011].
- **Proteómica:** El descubrimiento de los biomarcadores basados en la proteómica ha supuesto grandes implicaciones clínicas en la detección precoz de enfermedades. En el caso de la DMAE, el estudio de los niveles plasmáticos de homocisteína ha dado resultados controvertidos [Pinna et al. 2016]; no obstante, nuevos biomarcadores como el carboxietilpirrol (CEP) [Gu et al. 2010] o la carboximetilisina (CML) [Ni et al. 2009] parecen estar aumentados en pacientes con DMAE.
- **microARNs (miARNs):** Los miARNs circulantes son transportados en plasma por los exosomas [Grassmann et al. 2014]. En 2006, Poliseno y colaboradores [Poliseno et al. 2006] propusieron la influencia de los microRNAs en la angiogénesis *in vitro*. Más adelante, en 2008, Urbich y colaboradores [Urbich et al. 2008] mostraron que los miARNs intervenían en la biología vascular y Fish y colaboradores [Fish et al. 2008] demostraron que miR-126 directamente reprime reguladores negativos de la vía VEGF, apoyando su papel

para regular la integridad vascular y la angiogénesis. En relación con la DMAE, Lin y colaboradores [Lin et al. 2011] demostraron la disminución de miR - 23a en células del EPR de ojos con DMAE, y en casos de atrofia geográfica se encuentra una disminución de un enzima transcriptor de miARNs llamada DICER y un aumento de retrotransposones conocidos como Alu - ARN [Kaneko et al. 2011]. Estudios recientes han relacionado los miARNs también con los casos de DMAE neovascular. La presencia de hsa - mir - 301 - 3p, hsa - mir - 361 - 5p, y hsa - mir - 424 - 5p, sugiere la relación del TGF $\beta$ , mTOR en el proceso de neovascularización. Además, la represión de hsa - mir - 361 - 5p dio lugar *in vitro* a un aumento de la neovascularización [Grassmann et al. 2014], mientras que la transmisión exosómica de miR - 155 por células infectadas por el VEB parece aumentar el VEGF y la angiogénesis [Yoon et al. 2016]. Estos resultados hacen plantearse que la modificación de estos miARNs pueden constituir nuevas dianas terapéuticas.

- **Marcadores séricos:** Estos biomarcadores pueden servir también como parámetro de cribaje y para la monitorización de la enfermedad. En la DMAE destaca el estudio sobre la proteína C reactiva [Bhutto et al. 2011], el colesterol [Paun et al. 2015] y el VEGF [Brown et al. 2011] que parecen estar elevados en pacientes con esta enfermedad.

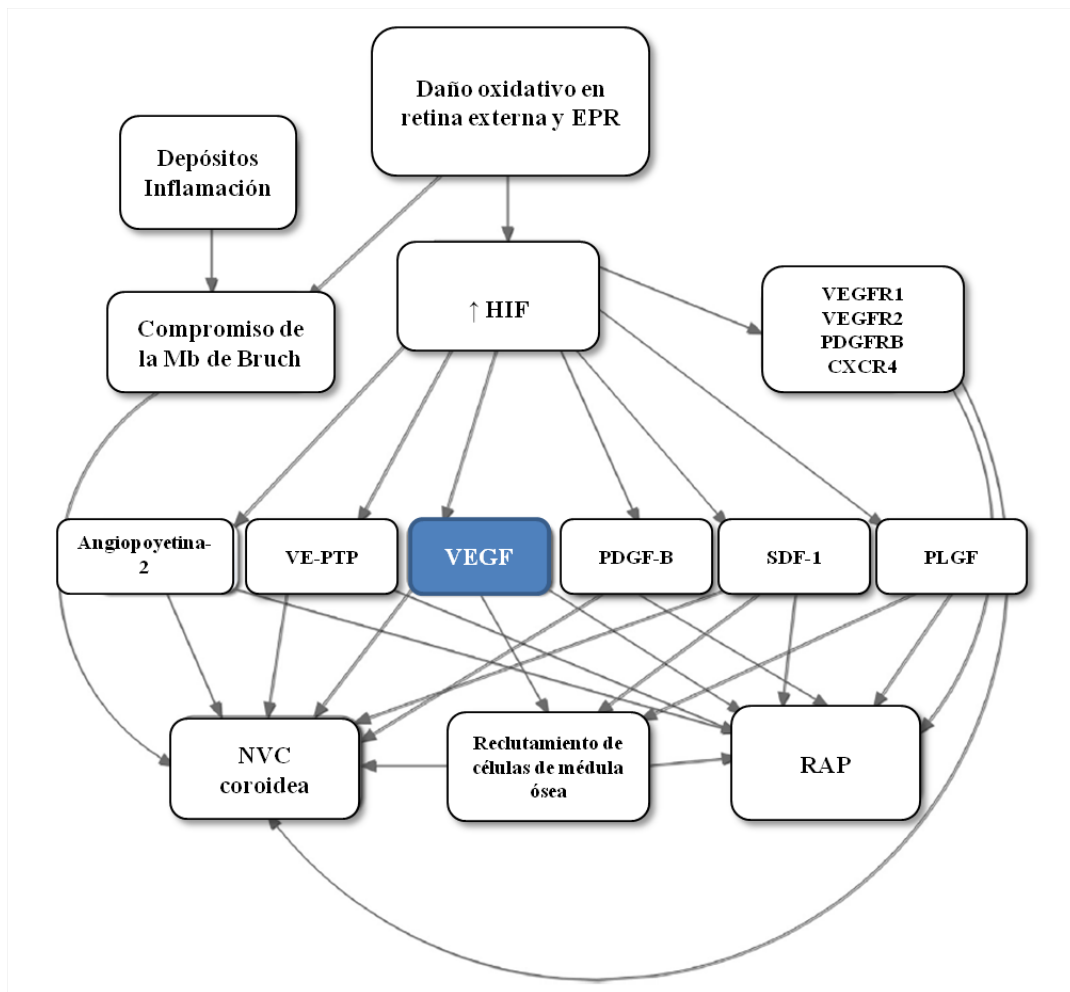
Un modelo de la patogenia de la DMAE centrado en estos nuevos biomarcadores es el siguiente: Con la edad, se produce un aumento del estrés oxidativo que resulta en niveles elevados de homocisteína en plasma. La función del EPR va empeorando y suceden varios eventos como la delección del ADN mitocondrial y su reordenamiento y un aumento de la oxidación lipídica y de sus productos finales como el CEP. Además, las proteínas comienzan a romperse y a glicosilarse dando niveles elevados de productos finales de glicosilación (AGES), como la CML o la pentosidina. La disfunción retiniana metabólica comienza a aparecer dando lugar a la fagocitosis de los SE de los fotorreceptores. Todos estos hechos dan lugar a un proceso inflamatorio, corroborado por el aumento en plasma de determinadas citoquinas como la IL - 6 y el CRP. Mutaciones en factores reguladores clave de la cascada del complemento (CFH, factor B del complemento (CFB), C2 y C3) dan lugar a una activación patológica y a una disregulación del mismo, aumentando de forma crónica la inflamación y ocasionando un daño final en las células del EPR. Este daño en las células del EPR y, posteriormente, en los fotorreceptores da lugar a la DMAE que puede cursar de forma seca mediante el desarrollo de atrofia geográfica o de forma húmeda mediante el desarrollo de neovascularización coroidea. En fases precoces de la DMAE seca se pueden ver en plasma niveles elevados de IP - 10. Cambios en los niveles plasmáticos de lipoproteínas y del colesterol se han asociado con el desarrollo de atrofia geo-



**Figura 1.18: Patogenia en la DMAE.** Fuente: Reproducción y traducción de imagen de “Risk factors and biomarkers of age - related macular degeneration”; Lambert y colaboradores [Lambert et al. 2016].

gráfica o de neovascularización, mientras que niveles elevados de ARN de Alu en las células del EPR se ven sobre todo en condiciones de atrofia geográfica. En fases avanzadas de la DMAE es posible encontrar niveles aumentados de fibrinógeno en plasma, y un aumento/empeoramiento de la neovascularización puede ocurrir cuando se encuentran elevados distintos factores (VEGF, CML, IL - 8, CEP) o cuando se expresan genotipos de alto riesgo (CFH, HTRA1, ARMS2) [Lambert et al. 2016] (Figura 1.18).

Entre el 10 - 15% de los pacientes va a desarrollar una DMAE neovascular [Frampton 2012]. El daño mantenido sobre el EPR y los fotorreceptores puede dar lugar a un daño en los vasos retinianos y coroides ocasionando isquemia y fuga vascular por alteración endotelial [Campochiaro 2015]. Se produce un aumento del factor - inducible de hipoxia - 1 (HIF - 1) el cual aumenta la expresión de diferentes productos vasoactivos entre los que destaca el VEGF [Campochiaro 2015]. El VEGF es una proteína fundamental para el crecimiento trófico de las células endoteliales que tiene un papel esencial en el desarrollo de la neovascularización coroidea. Es una proteína reguladora de la angiogénesis que interviene en la proliferación, supervivencia, migración celular y permeabilidad vascular [Rubio et al. 2016]. Cuando niveles elevados de VEGF y angiopoyetina - 2 (una proteína que también interviene en el desarrollo vascular y cuya síntesis aumenta en la isquemia retiniana [Hackett et al. 2000]) se asocian con una alteración en la membrana de Bruch y el EPR se desarrolla la neovascularización coroidea que puede quedarse limitada bajo el EPR o profundizar hacia la retina [Campochiaro 2015]. En el caso de la pro-



**Figura 1.19: Patogénesis de la neovascularización en la DMAE.** Fuente: Reproducción y traducción de imagen de “*Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases*”; Campochiaro [Campochiaro 2015].

liferación angiomasiosa retiniana, el crecimiento neovascular sucede cuando la concentración de VEGF a nivel de los fotorreceptores es tan alta que llega al plexo capilar profundo. A ese nivel hay una gran expresión de angiopoyetina - 2 [Hackett et al. 2000] y, asociados, dan lugar a los neovasos [Campochiaro 2015] (Figura 1.19).

#### 1.4.5 Síntomas y signos clínicos

##### *Síntomas*

La DMAE es una enfermedad que puede presentar distinta sintomatología en función del momento evolutivo en que nos encontremos. Sus manifestaciones clínicas pueden variar desde el estado asintomático en el inicio de la enfermedad hasta la disminución de la AV en fases avanzadas [Kanagasingam et al. 2014]. Es importante resaltar que otras patologías retinianas pueden

presentar similar sintomatología por lo que una adecuada exploración va a ser necesaria para la confirmación diagnóstica de la DMAE. Dentro de la sintomatología ocular encontramos:

- **Metamorfopsias o deformación visual:** El desplazamiento espacial de los fotorreceptores debido a las lesiones que acontecen en al área macular produce una alteración de su posición espacial con respecto al córtex cerebral lo que dará una sensación visual de distorsión.
- **Disminución de AV:** Puede ir desde una visión borrosa en fases iniciales hasta un deterioro profundo de la AV [Loewenstein 2007].
- **Escotoma central:** Dado que la zona afectada es la zona macular (zona central de la visión), se puede producir un escotoma central que los pacientes refieren como una mancha fija negra. Estos pacientes desarrollan una fijación excéntrica macular para minimizar el impacto del escotoma [Fletcher et al. 1997].
- **Alteración de la sensibilidad al contraste y del color**
- **Disminución de la adaptación a la oscuridad y a la luz** [Owsley et al. 2001; Phipps et al. 2003].
- **Alucinaciones visuales en fases tardías de la enfermedad** [Khan et al. 2008].

Otros síntomas no visuales son [Cimarolli et al. 2016]:

- **Incapacidad funcional.**
- **Depresión y ansiedad:** Dentro de los pacientes adultos con incapacidad visual, la DMAE es la que mayor riesgo de depresión conlleva con tasas de hasta un 39% [Cimarolli et al. 2016]. La prevalencia de la ansiedad en pacientes con DMAE se estima en torno al 9.6 - 30% [Cimarolli et al. 2016].

### *Signos clínicos*

#### **Drusas:**

Las drusas son acumulaciones de material extracelular y lípidos inmediatamente por debajo del EPR [Khan et al. 2016]. Pueden ser manifestaciones del envejecimiento normal o de una patología retiniana [Ardeljan et al. 2013] y se consideran uno de los criterios esenciales para el

diagnóstico de la DMAE. Al igual que sucede con la DMAE, la incidencia y prevalencia de los distintos subtipos es diferente en función de las poblaciones analizadas [Khan et al. 2016].

*Biogénesis:*

Con los años comienzan a acumularse lipoproteínas en la membrana de Bruch, alterándose la conductividad y la función de transporte entre el EPR y la coroides sobre todo en el área macular [Moore et al. 1995]). Esta alteración en la conductancia parece estar relacionada sobre todo con el contenido lipídico [Starita et al. 1996]. Cuando se producen fenómenos de oxidación, las lipoproteínas generan intermediarios tóxicos que activan la cascada inflamatoria mediante la activación del complemento y el reclutamiento de células dentríticas. Este estado inflamatorio crónico lleva, por mecanismos que se desconocen por el momento [Khan et al. 2016] y donde podrían interferir los exosomas [Wang et al. 2009], al acúmulo de material extracelular y proteínas intracelulares conformando las drusas. Una de las teorías propuestas consiste en el acúmulo natural de cristales de hidroxapatita por debajo del EPR los cuales serán posteriormente rodeados por los lípidos y por las proteínas constituyentes de las drusas (factores del complemento, beta amiloide...) haciendo que estos depósitos crezcan progresivamente [Thompson et al. 2015].

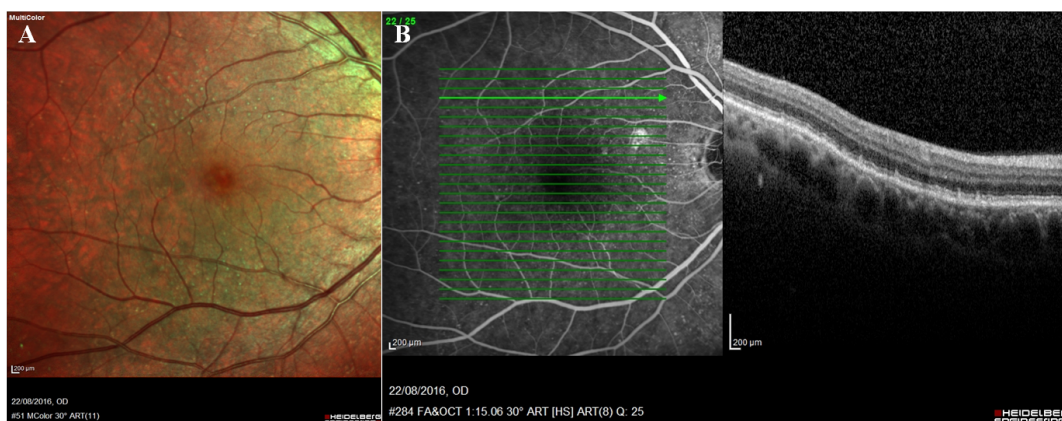
*Tipos:*

Históricamente, la clasificación de las drusas se ha realizado en base a hallazgos clínicos y en retinografía [Davis et al. 2005]. Según esta clasificación se distinguían drusas duras (aquellas menores de 63  $\mu$ ), drusas intermedias (entre 53 y 125  $\mu$ ) y drusas blandas o grandes (aquellas mayores de 125  $\mu$ ). Sin embargo, las drusas blandas de pequeño tamaño también pueden existir y quedarían excluidas de esta clasificación. El creciente desarrollo de los métodos de imagen y los nuevos conocimientos en torno a los diferentes tipos de drusas ha hecho que en la actualidad se distingan: (1) Drusas duras, (2) drusas cuticulares, (3) drusas blandas, (4) pseudodrusas reticulares (Figura 1.20). Sus diferencias en un análisis multimodal de imagen quedan representadas en la siguiente tabla 1.5.

Algunos autores diferencian el subtipo de drusas calcificadas [Suzuki et al. 2015]. No obstante, los hallazgos obtenidos por Thompson y colaboradores [Thompson et al. 2015] de depósitos de hidroxapatita en todos los tipos de depósito subretiniano sugieren la idea de que todas las drusas están calcificadas en mayor o menor medida.

	Drusas pequeñas		Drusas grandes	Depósitos subretinianos
	Drusas duras	Drusas cuticulares	Drusas blandas	Pseudodrusas reticulares
<b>Retinografía</b>	• Drusas < 63 μ blanco-amarillentas de bordes definidos; en mácula y periferia.	• Drusas numerosas (> 50) y pequeñas (25-75 μ), más frecuentes en la periferia.	• Depósitos amarillentos, > 125 μ más frecuentes en polo posterior.	• Depósitos puntiformes o reticulares de tamaño variable más frecuentes en perifovea superior. Se ven mejor con filtro infrarrojo.
<b>AF</b>	• Hipo autofluorescentes a veces con hiper autofluorescencia alrededor.	• Puntos hipo autofluorescentes.	• Hiper autofluorescencia moderada	• Patrón reticular hipo autofluorescente
<b>OCT</b>	• Pequeños depósitos hiperreflectivos sub-EPR..	• Forma prolata de hiperreflectividad media sub-EPR.	• Depósitos hiperreflectivos de mayor tamaño sub-EPR	• Depósitos entre EPR y EZ ( estadios 1 y 2), traspasando EZ (estadio 3) y en retina neurosensorial( estadio 4)
<b>AGF</b>	• Hiperfluorescencia media.	• “ En cielo estrellado”: Múltiples puntos hiperfluorescentes más evidentes en tiempos tardíos.	• Variable, pero es frecuente hiperfluorescencia tardía	• Hipo o isofluorescencia
<b>AVI</b>	• Hiperfluorescencia.	• Hiperfluorescencia precoz.	• Hipo fluorescencia.	• Hipo fluorescencia en fases medias y tardías.

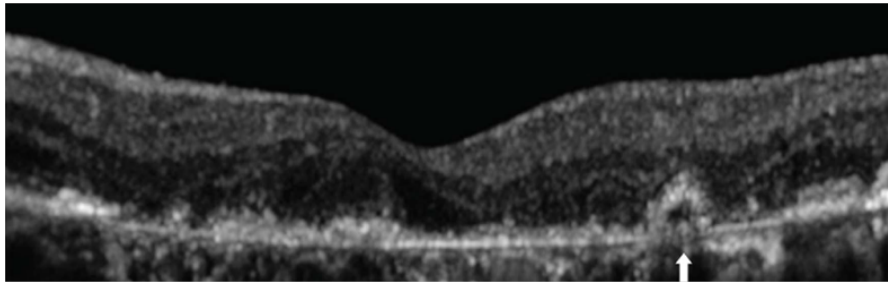
**Tabla 1.5: Clasificación de las drusas.** Fuente: Tabla basada en tabla adjunta en “Differentiating drusen: Drusen and drusen - like appearances associated with ageing, age - related macular degeneration, inherited eye disease and other pathological processes”; Khan y colaboradores [Khan et al. 2016].



**Figura 1.20: Pseudodrusas recitulares.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia” (A) Retinografía multicolor donde se visualizan las pseudodrusas de coloración verde, (B) SD - OCT en que se visualizan las pseudodrusas más allá del EPR.

**Corrugaciones de retina externa/ Estructuras piramidales hiperreflectivas/ Drusas fantasma:**

En estados de DMAE avanzada (atrófica o neovascular) se han descrito este tipo de alteraciones que acontecen principalmente en zonas de atrofia del EPR. Fleckenstein y colaboradores en 2008 [Fleckenstein et al. 2008] las describieron por primera vez como estructuras cupuliformes con detritus en la OCT y que presentaban aumento de la autofluorescencia. Años más tarde, en 2014, Oto y colaboradores [Oto et al. 2014] revelaron que esa estructura curvilínea hiperreflectiva en la OCT se correspondía histológicamente con un depósito basal laminar en un área de atrofia del EPR y le proporcionaron el nombre de corrugaciones de retina externa. No obstante, en ese mismo año Bonnet y colaboradores [Bonnet et al. 2014] prefirieron el empleo de estructuras hiperreflectivas piramidales para denominar a estas estructuras que eran hipoautofluorescentes y con una peculiar reflectividad del verde en la retinografía multicolor. El análisis con SD - OCT (Figura 1.21) de estas estructuras cupuliformes permite ver un borde hiperreflectivo heterogéneo con un contenido hiporreflectivo en su interior que parece corresponderse con la involución de algunas drusas blandas. Estas drusas en un inicio presentarían algo de hiperfluorescencia, pero, a medida que involucionaran, la perderían hasta pasar a ser hipofluorescentes [Bonnet et al. 2014]. Su imagen en OCT, donde parece que solo queda el esqueleto externo de la drusa, junto con esta teoría patogénica, ha hecho que también se las pueda llamar como drusas fantasmas.



**Figura 1.21: Imagen de OCT de corrugación de la retina externa.** Fuente: “*Hyperreflective pyramidal structures on optical coherence tomography in geographic atrophy areas*”; Bonnet y colaboradores [Bonnet et al. 2014].

**Cambios pigmentarios del EPR:** Con la edad, las células del EPR cargadas con lipofucsina se van perdiendo y son fagocitadas por sus células vecinas. Generalmente no se producen cambios en el fondo de ojo pero, en ocasiones, el número de células suprimidas puede ser suficiente como para objetivar un moteado difuso de pigmento o un patrón hiperreticular lineal [Wang et al. 2009]. Las anomalías presentes en la DMAE pueden clasificarse como:

- **Hiperpigmentación o pigmentación aumentada:** Se correlaciona con áreas localizadas de hipertrofia del EPR.
- **Hipopigmentación o despigmentación:** Se correlaciona con células atenuadas e hipopigmentadas del EPR.

La secuencia de acontecimientos que dan lugar a estas alteraciones pigmentarias son similares a las acontecidas en el desarrollo de atrofia. Cuando muere una célula del EPR, ésta es fagocitada por sus células vecinas, las cuales se van llenando de lipofucsina y al final pierden su capacidad para fagocitar y mueren. A medida que se van perdiendo células, se activa un mecanismo compensador por el que las células vecinas migran y aumentan su tamaño. Esto produce células adelgazadas e hipopigmentadas adyacentes a una zona de hiperpigmentación focal. Finalmente, estas células no pueden estirarse más para rellenar el hueco y se produce atrofia [Sarks et al. 1988; Wang et al. 2009].

### **Desprendimientos del EPR:**

Se denomina desprendimiento del epitelio pigmentario (DEP) a la separación anatómica del EPR de la membrana de Bruch. Aunque puede estar presente en un amplio número de patologías retinianas, lo más frecuente es que se relacione con la DMAE donde puede aparecer tanto en formas iniciales como más avanzadas ya sean de tipo atrófico o neovascular. Se distinguen distintos tipos que se pueden diferenciar en (1) DEPs no vascularizados (DEP drusenoidal y

DEP seroso) y en (2) DEPs vascularizados (DEP fibrovascular y DEP serovascular) [Mrejen et al. 2013] (Figura 1.6). Otros tipos de DEPs son el DEP hemorrágico, cuando lo que separa el EPR de la membrana de Bruch es sangre y el DEP en capas de cebolla en el que se objetiva la presencia de imágenes hiperreflectivas laminares por debajo del EPR que se deben al depósito sub - EPR de colesterol en pacientes con hipercolesterolemia [Pang et al. 2015].

	Retinografía	SD-OCT	Autofluorescencia	AGF
DEP DRUSENOIDE	Elevaciones amarillentas bien delimitadas, se pueden confundir con drusas blandas de gran tamaño.	Banda hiperreflectiva de contorno suave y a veces ondulado. Depósito homogéneo subEPR denso de hiperreflectividad moderada o alta.	Hiper>iso>hipofluorescentes (Schmitz-Valckenberg S. y col.2009)	Hiperfluorescencia en fases iniciales que puede aumentar en fases tardías sin fuga de colorante.
DEP SEROSO	Desprendimiento redondeado amarillento de bordes bien definidos	Elevación abrupta bien delimitada del EPR con espacio homogéneo hiporreflectivo subyacente.	Lo más frecuente es hiperfluorescencia en la zona del desprendimiento rodeada de halo hipofluorescente. (Karadimas P y col. 2005), pero pueden darse otros patrones. (Mrejen et al, 2013)	Hiperfluorescencia en fases iniciales bien delimitada y aumento de la misma por el relleno con el colorante en fases medias y tardías. (Yanuzzi LA y col 1997, Zayit-Soudry S. y col 2007)
DEP VASCULARIZADO: - DEP fibrovascularizado - DEP sero-vascularizado	Desprendimiento irregular, que puede presentar zonas más solidificadas con cambios pigmentarios y hallazgos típicos de NVC. (Mrejen et al, 2013)	Elevación irregular del EPR y banda hiperreflectiva adherida al mismo correspondiendo con CNV. El material contenido puede ser de tipo hiperreflectivo en su totalidad o presentar zonas serosas hiporreflectivas.	Hiperfluorescencia en la zona del desprendimiento rodeada de halo hipofluorescente. (Karadimas P y col. 2005)	Hiperfluorescencia irregular inicial que aumenta hasta producir la tinción del tejido subepitelial. Fuga en tiempos tardíos por el proceso neovascular. (Mrejen et al, 2013)

**Tabla 1.6: Tipos de DEP.** Fuente: Tabla basada en “*Multimodal imaging of pigment epithelial detachment: A Guide to Evaluation*”; Mrejen y colaboradores [Mrejen et al. 2013].

### **Ruptura del EPR:**

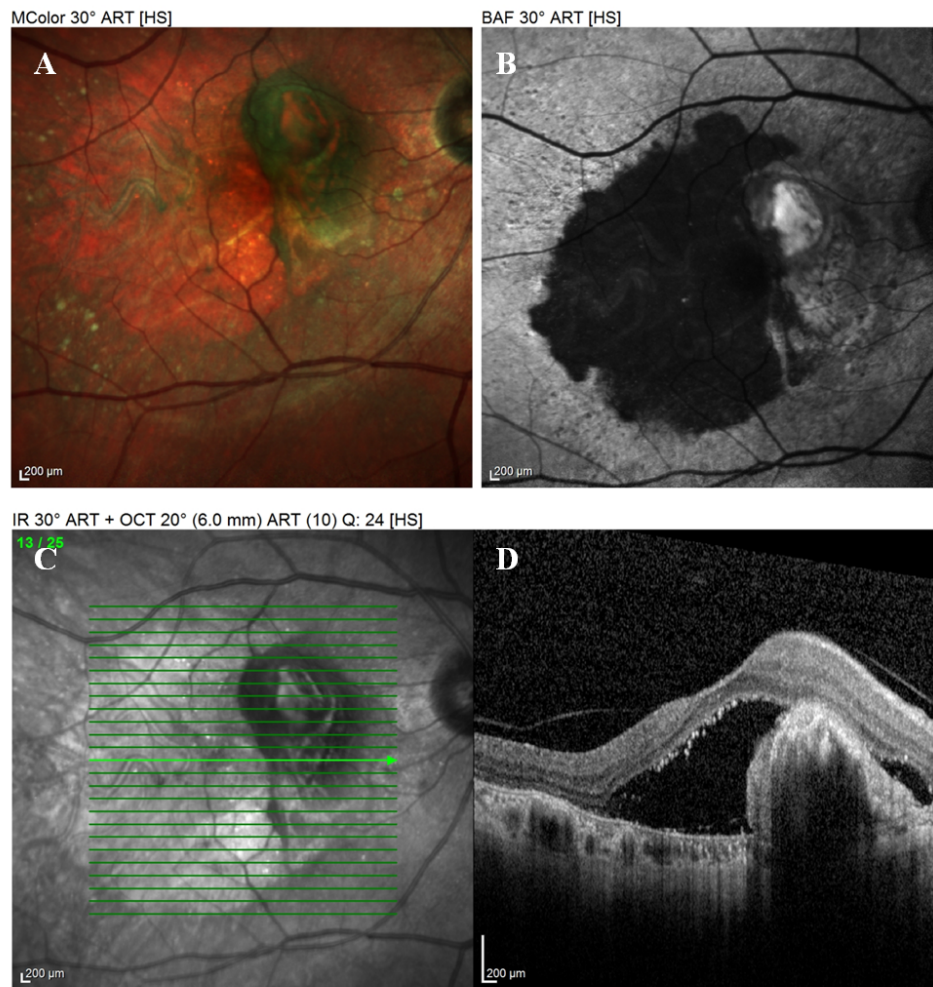
Los DEPs vascularizados en su evolución pueden desarrollar rupturas (Figura 1.22). Estas rupturas pueden aparecer de forma espontánea en el curso natural de la enfermedad en el 6 - 12% [Sarraf et al. 2013] de los casos. No obstante, la incidencia aumenta hasta el 25% [Cunningham et al. 2011] en los casos de tratamiento con antiVEGF. En ambos casos, las rupturas típicamente se producen por una tracción del complejo neovascular y suelen romperse en el punto en que el EPR se separa de la membrana de Bruch, pues es la zona más vulnerable a las fuerzas hidrostáticas. Factores de riesgo para esta ruptura son la altura, el diámetro y el área máximas y la presencia de fluido subretiniano [Cho et al. 2016]. En casos tratados se han relacionado con mayor riesgo de ruptura los DEP fibrovasculares y las neovascularizaciones típicas y proliferación angiomasosa retiniana frente a la vasculopatía polipodea [Cho et al. 2015; Cho et al. 2016]. Aunque si se afecta al área foveal el pronóstico visual generalmente es malo, el tratamiento con inyecciones de antiVEGF aporta beneficios funcionales y anatómicos [Heimes et al. 2016].

### **Apertura del EPR:**

Recientemente se ha descrito este nuevo hallazgo que se define como la presencia de una o múltiples discontinuidades que pueden acontecer tanto en la base como en el ápex de un DEP no vascularizado en el contexto de la DMAE [Querques et al. 2016]. A diferencia de las rupturas del EPR, en estos casos no se objetiva ondulación o retracción del EPR y en vez de mantenerse estables en el tiempo se objetiva un crecimiento en su extensión. Entre las teorías etiopatogénicas que se proponen está la regresión de las drusas en un DEP drusenoide resultando en un área de atrofia del EPR. Hasta la fecha hay pocos casos descritos, pero parece relacionarse con una alta tasa de progresión a la atrofia o a la neovascularización.

### **Atrofia no geográfica y atrofia geográfica del EPR:**

En la DMAE se entiende por atrofia la pérdida focal de fotorreceptores, EPR y coriocapilar. Aunque hasta la fecha, continúan siendo tema de controversia sus mecanismos fisiopatológicos, se piensa que un daño inicial sobre el EPR conllevaría posteriormente la atrofia progresiva de la coriocapilar y de los fotorreceptores [Holz et al. 2007]. En fases de DMAE inicial e intermedia es posible diferenciar zonas de atrofia del EPR. El estudio realizado por Bindewald y colaboradores en 2005 [Bindewald et al. 2005], basado en el análisis de autofluorescencia de estas formas iniciales de DMAE seca mostró la presencia de 8 patrones diferentes de autofluorescencia previas al desarrollo de la forma avanzada de DMAE seca que recibe el nombre de



**Figura 1.22: Ruptura del EPR.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia” (A) Retinografía multicolor en que se observa el área desnuda de EPR el cual está replegado en la región superior derecha, (B) AF de onda corta que muestra el área hipofluorescente correspondiente a la zona de ausencia del EPR y una zona hiperfluorescente que se corresponde con el EPR replegado sobre sí mismo, (C) SD - OCT que muestra la ruptura del EPR en el margen del DEP.

atrofia geográfica (AG). La prevalencia de la AG en pacientes mayores de 75 años es del 3,5 % [Sikorav et al. 2016]) y el 80 - 90 % de los casos de DMAE inicial o intermedia van a evolucionar a AG. Por este término se entiende la atrofia progresiva del EPR, la coriocapilar y los fotorreceptores [Lim et al. 2012]. La AG se caracteriza en la retinografía por la presencia de áreas mayor o igual a 175  $\mu$  de diámetro abruptamente demarcadas de hipopigmentación o ausencia aparente del EPR a través de las cuales se visualizan los vasos coroideos con mayor falicidad [Kanagasingam et al. 2014]. La pérdida visual que acontece en este tipo de DMAE suele ser lenta y progresiva pudiendo encontrar indemnidad de la zona foveal hasta fases avanzadas de la enfermedad [Kanagasingam et al. 2014]. No obstante, constituye el 20 % de todos los casos de ceguera legal en Norteamérica [Holz et al. 2014] por lo que es importante una adecuada evaluación y un análisis de su progresión. Es importante el estudio tanto de las zonas de AG franca como de su borde perilesional pues estas zonas también presentan una disminución de la sensibilidad retiniana [Takahashi et al. 2016]. Para el diagnóstico de la AG hay distintas técnicas de imagen disponibles:

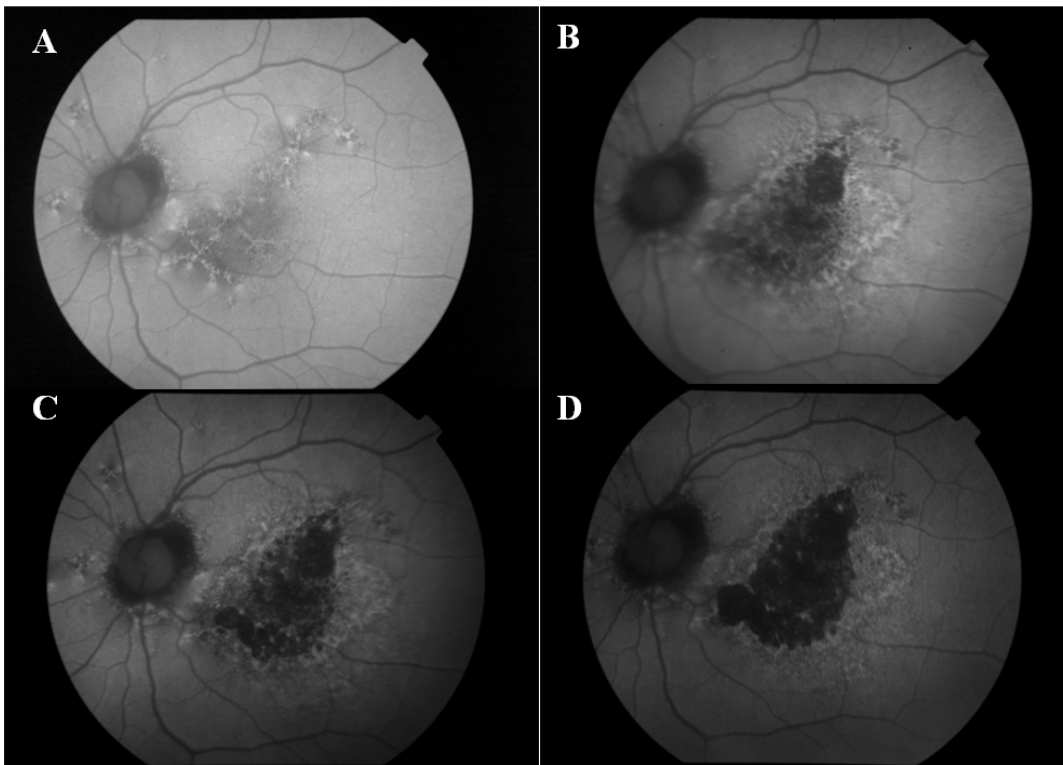
- Retinografía: En los ensayos clínicos se ha definido la AG como un área bien demarcada mayor de 175  $\mu$  diámetro de aparente ausencia del EPR en que se visualizan los vasos coroideos sin signos de DMAE neovascular [Gobel et al. 2011]. En ocasiones, el bajo contraste entre las áreas hipopigmentadas y atróficas de la retina con áreas sanas puede ser difícil de realizar. Para facilitar esta diferenciación, se puede emplear la AF la cual detecta mejor fases precoces [Domalpally et al. 2016] y el análisis multicolor realizado con los métodos de oftalmoscopia de láser de barrido.
- Angiografía fluoresceínica (AGF): Las áreas de atrofia se ven como regiones bien demarcadas hiperfluorescentes correspondientes a un efecto ventana por ausencia del EPR que no crecen en tiempos tardíos [Gobel et al. 2011].
- Autofluorescencia (AF): La AG se visualiza como un área de hipofluorescencia. La AF supone una de las técnicas más empleadas para valorar la atrofia pese a sobreestimar la afectación foveal por la presencia de pigmentos xantófilos en el área macular. Para suplir esta limitación, es posible en lugar del empleo de filtros con luz azul (488 nm) que son absorbidos por los pigmentos xantófilos el uso de la AF cercana al infrarojo (820 nm) [Kellner et al. 2010]. Se han descrito diferentes patrones de autofluorescencia en función de la imagen del área perilesional a la AG con diferente velocidad de crecimiento [Holz et al. 2007].

- Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD - OCT): En la SD - OCT se encuentra un adelgazamiento o pérdida de las líneas de la retina externa correspondientes a la nuclear externa, MLE, ZE y al complejo EPR/ membrana de Bruch junto con un aumento de la transmisión coroidea [Fleckenstein et al. 2008]. También pueden usarse métodos de OCT polarizada que son más fiables que el resto de técnicas para descartar la afectación foveal [Sayegh et al. 2014]). Otras técnicas que han demostrado la capacidad de diferenciar la afectación foveal es la imagen óptica adaptativa [Querques et al. 2016]. La OCT también sirve para evaluar la afectación de los fotorreceptores en el área adyacente a la AG [Takahashi et al. 2016].

En relación con la progresión, se ha visto que pacientes con drusas  $>125 \mu$  e hiperpigmentación desarrollan AG en 5 ó 6 años (Figura 1.23). Por el contrario, en los pacientes que ya presentan hipopigmentación la AG aparece antes con una media de 2,5 años [Holz et al. 2014; Klein et al. 2008a]. La velocidad media de crecimiento de las áreas de atrofia se sitúa entre 1.2 y 2.8 mm anuales [Holz et al. 2014]), siendo esta velocidad de crecimiento mayor en lesiones inicialmente más grandes [Csaky et al. 2008] y multifocales [Klein et al. 2008b].

La velocidad de crecimiento del área de AG se ha relacionado también con diferentes patrones en la autofluorescencia perilesional. Los patrones difusos, en concreto el goteo difuso, y el patrón en banda son los que mayor velocidad de crecimiento presentan [Holz et al. 2007]. Esta diferencia parece deberse a un fondo genético diferente [Fleckenstein et al. 2016].

Aunque la AG y la neovascularización constituyen los dos subtipos de DMAE avanzada no son mutuamente excluyentes [Kaszubski et al. 2016]. Hasta 1/4 de los pacientes con DMAE neovascular naive presentan AG [Sikorav et al. 2016]. En caso de coexistir, la AG generalmente se desarrolla primero con tasas de progresión de entre el 11 [Klein et al. 2008b] - 20 % [Schatz et al. 1989] a 5 años. Aunque se ha sugerido la idea de que el tratamiento con antiVEGF pudiera estimular la tasa de crecimiento de la atrofia, los resultados hasta la fecha son contradictorios [Thalgott et al. 2016].



**Figura 1.23: Progresión de atrofia del EPR.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia” AF de onda corta que muestra el crecimiento de un área de AG; (A) en el momento basal (B) a los 3 años, (C) a los 5 años, (D) a los 6 años del diagnóstico.

### **Neovascularización coroidea:**

El desarrollo de la forma de neovascular en la DMAE, uno de los estados de la DMAE avanzada, acontece en el 10 - 15 % de los casos [Group 2000]. Este estado, que se conoce también como DMAE húmeda, exudativa o neovascular, se refiere al desarrollo o proliferación de neovasos desde debajo del EPR llegando a romperlo y proliferando hasta la retina o desde las capas neurosensoriales de la retina creciendo en profundidad hacia la coroides [Kanagasingam et al. 2014]. La DMAE húmeda es la principal causa de disminución de la visión [Frampton 2012]. Su curso es rápido y progresivo. No obstante, el tratamiento con fármacos antiVEGF nos ha permitido modificar el pronóstico y la evolución de la enfermedad [Maguire et al. 2016].

Se han desarrollado diferentes clasificaciones para los tipos de DMAE neovascular:

- **Localización del complejo neovascular:**

- Extrafoveal: A más de 200  $\mu$  de la ZAF.
- Yuxtafoveal: A menos de 200  $\mu$  de la ZAF.

– Subfoveal: Por debajo de la fovea.

• **Tipo del complejo neovascular:**

– Según angiografía con fluoresceína (AGF): En 1991, se llevó a cabo el *Macular Photocoagulation Study (MPS)* [Group 1991]. Este grupo, con el objetivo de intentar elucidar qué pacientes se beneficiarían de la fotocoagulación con láser térmico para erradicar el complejo neovascular, estableció una clasificación de los tipos de membrana neovascular en función de los hallazgos en la AGF. Diferenciaron:

\* Neovascularización coroidea clásica: Área bien demarcada de hiperfluorescencia en tiempos iniciales de la angiografía y en que se objetiva fuga tardía del colorante que dificulta la identificación de los límites del complejo neovascular.

\* Neovascularización coroidea oculta: Esta puede ser de dos tipo:

· DEP fibrovascular con fuga tardía indeterminada: Punteado hiperfluorescente en los primeros 2 minutos del angiograma con tinción o fuga del colorante hacia el espacio subretiniano en torno a los 10 minutos.

· Fuga tardía indeterminada: En fases tardías del angiograma aparece un moteado hiperfluorescente con acumulación del colorante en el espacio subretiniano que impide la correcta diferenciación de los bordes del complejo neovascular subyacente el cual tampoco es visible en tiempos iniciales.

– Según tomografía de coherencia óptica (OCT): En 2010 Freund y colaboradores [Freund et al. 2010] en base a una detallada visualización de las imágenes de SD

- OCT y la clasificación histológica de Gass [Gass 1994] proponen:

\* Lesiones neovasculares de tipo 1: El complejo neovascular se forma entre el EPR y la membrana de Bruch. Angiográficamente se correspondería a las lesiones de tipo oculto incluyendo tanto a los DEPs fibrovasculares como a la fuga de origen indeterminado (Figura 1.24). Dentro de las lesiones neovasculares tipo 1 se encuentra una variante que recibe el nombre de vasculopatía polipoidea (VCP) (Figura 1.27).

\* Lesiones neovasculares de tipo 2: En este caso el complejo neovascular ha penetrado el EPR/ membrana de Bruch y prolifera en el espacio subretiniano. Con AGF, los vasos siguen un patrón clásico (Figura 1.25).

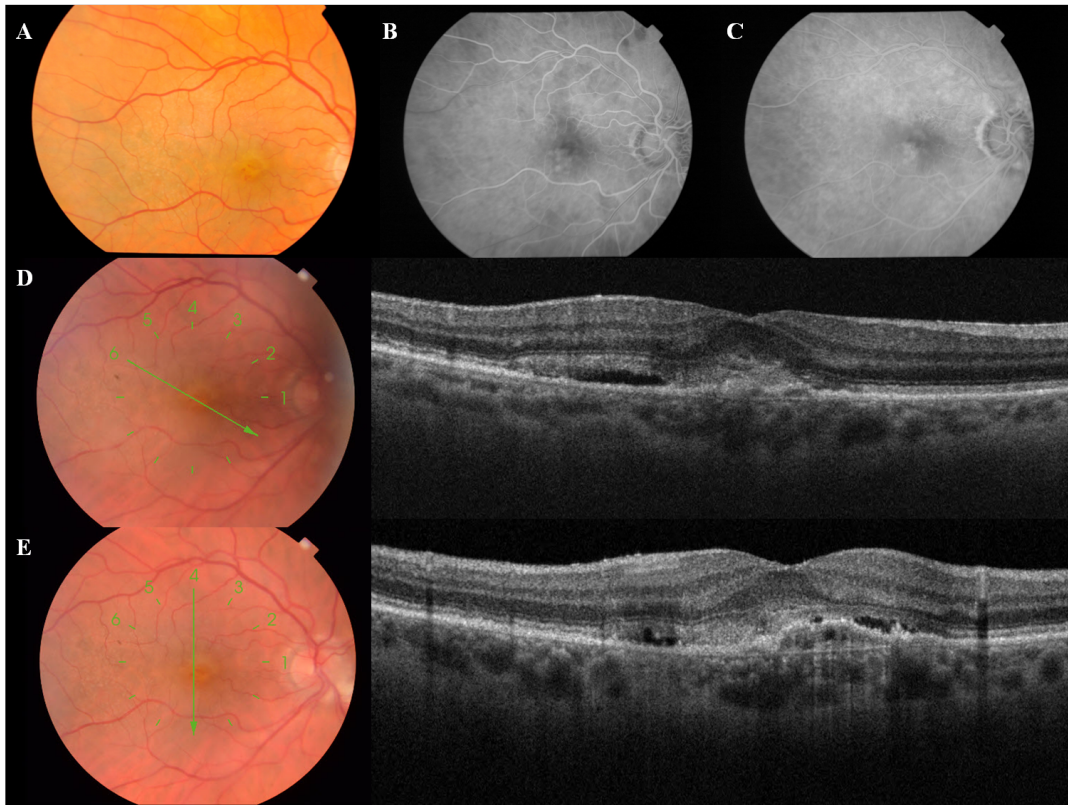
- \* Lesiones neovasculares de tipo 3: Reciben el nombre de proliferación angiomasosa retiniana (RAP). En ellas los neovasos comienzan a nivel intrarretiniano para, en estadios avanzados, anastomosarse con neovasos coroides. En la AGF siguen un patrón de tipo oculto (Figura 1.26).
- \* Lesiones neovasculares de tipo mixto: Cuando concurren más de uno de los subtipos anteriores.

Otra clasificación muy extendida diferencia las membranas neovasculares en típicas (lesiones neovasculares tipo 1 (excepto VCP) y tipo 2) y en atípicas (lesiones neovasculares tipo 3 y la VCP).

#### *Membrana neovascular tipo 1:*

Como hemos comentado con anterioridad, en este tipo de lesiones el componente neovascular se desarrolla en el espacio limitado por arriba por el EPR y por debajo por la membrana de Bruch. Es el tipo más frecuente de membrana neovascular [Freund et al. 2010]. Este tipo de neovascularización puede permanecer indetectable durante años pues la exudación puede ser mínima y el paciente mantenerse con buenas visiones; no obstante, cuando la exudación aumenta, lo que suele suceder en forma de líquido subretiniano (LSR), la visión empeora. La existencia de líquido o quistes intrarretinianos sucede al producirse una ruptura de la MLE junto con la disfunción del EPR lo que conlleva peor pronóstico. Este tipo de membranas al localizarse por debajo del EPR es frecuente que, en su crecimiento, produzcan DEPs vascularizados tanto en su forma fibrovascular como serosa. La presencia de rupturas del EPR también es frecuente. Por el contrario, el desarrollo de AG es poco frecuente en este tipo de lesiones [Engelbert et al. 2010] y se ha llegado a pensar que el componente neovascular constituye una forma alternativa de nutrición de la retina isquémica [Grossniklaus et al. 2004]. Al considerarse neovasos relativamente maduros, su respuesta al tratamiento con antiVEGF es parcial, produciéndose una disminución de la exudación pero en raras ocasiones la regresión del componente neovascular [Engelbert et al. 2010].

- Retinografía: Pueden encontrarse drusas, cambios pigmentarios y hemorragias retinianas. Al localizarse estas membranas por debajo del EPR es frecuente encontrar DEPs vascularizados.



**Figura 1.24: Membrana neovascular tipo 1.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia” (A) Retinografía color en que se observa componente hemorrágico en el área macular. (B) AGF en fase arteriovenosa y (C) AGF en fase venosa tardía en que se objetiva un patrón angiográfico de tipo oculto. (D) y (E) OCT donde se objetiva la presencia de un DEP fibrovascularizado con LSR.

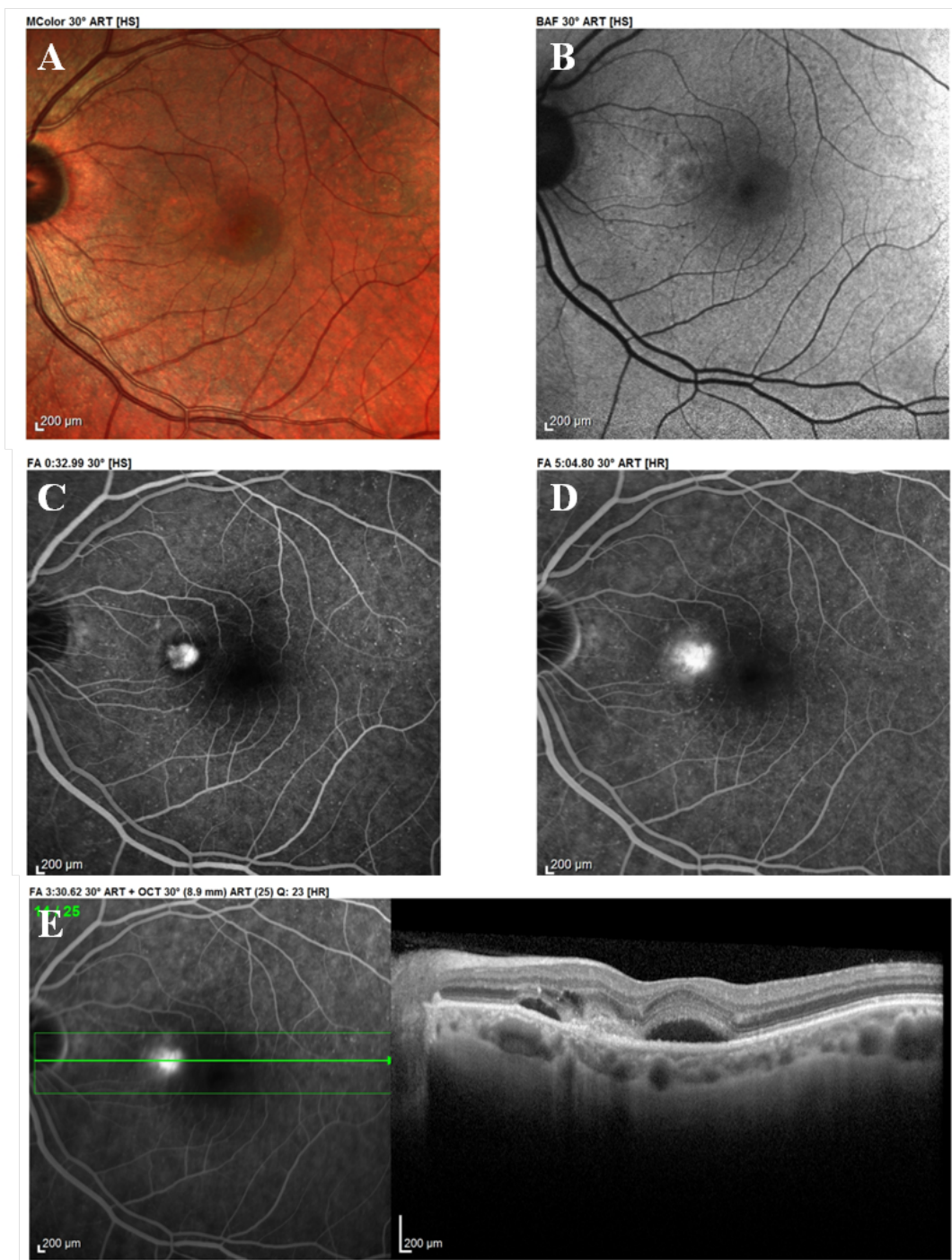
- Tomografía de coherencia óptica (OCT): Se objetiva una banda hiperreflectiva por debajo del EPR y si hay DEP generalmente adherida a su superficie inferior. La forma de exudación más frecuente es en forma de LSR.
- Angiografía con fluoresceína (AGF) / Angiografía con verde de indocianina (AVI): En la AGF se visualizan como un patrón de tipo oculto ya sea de DEP fibrovascular o de fuga de origen indeterminado. En el AVI se visualizan con una hipercianescencia en placa.
- Angiografía con tomografía de coherencia óptica (angio - OCT): Se distinguen dos tipos de imágenes: “en medusa” donde los vasos ramificados desde el centro de la lesión en todas direcciones o “en abanico de mar” donde más del 90 % de la membrana irradia desde un lado de la lesión donde se objetiva el gran árbol vascular [Kuehlewein et al. 2015].

#### *Membrana neovascular tipo 2:*

En este caso el tejido neovascular ha penetrado la membrana de Bruch y el EPR y se sitúa en el espacio subreriniano donde prolifera. La forma de exudación más frecuente es la presencia de

fluido intrarretiniano (FIR) y al estar localizada justo por debajo de los fotorreceptores es frecuente que produzca una disrupción de los mismos con peor pronóstico funcional [Freund et al. 2010; Mrejen et al. 2015]. Este tipo de membranas al inicio son muy sensibles al tratamiento con antiVEGF, no obstante, formas más avanzadas responden peor [Freund et al. 2010].

- Retinografía: Al igual que en las membranas tipo 1 es posible encontrar drusas, cambios pigmentarios y hemorragias. En ocasiones el componente neovascular puede intuirse a modo de placa por encima del EPR.
- Tomografía de coherencia óptica (OCT): Banda hiperreflectiva por encima del EPR que se corresponde con el componente neovascular. Asociado a ello encontramos un adelgazamiento y disrupción de los fotorreceptores con alteración en la integridad de la ZE y la MLE. También se puede observar un adelgazamiento de la nuclear externa. Es frecuente encontrar líquido intrarretiniano (LIR) y no suele haber DEPs.
- Angiografía con fluoresceína (AGF) / Angiografía con verde de indocianina (AVI): Este tipo de membranas sigue un patrón de tipo clásico en la AGF. En el AVI son difíciles de identificar por la gran fluorescencia de la circulación coroidea [Freund et al. 2010].
- Angiografía con tomografía de coherencia óptica (angio - OCT): Se visualizan con forma de medusa o glómulo a nivel de la retina externa o coriocapilar. Más profundamente, es posible visualizar uno o más vasos nutricios que se extienden hacia capas coroideas profundas [Souied et al. 2016].

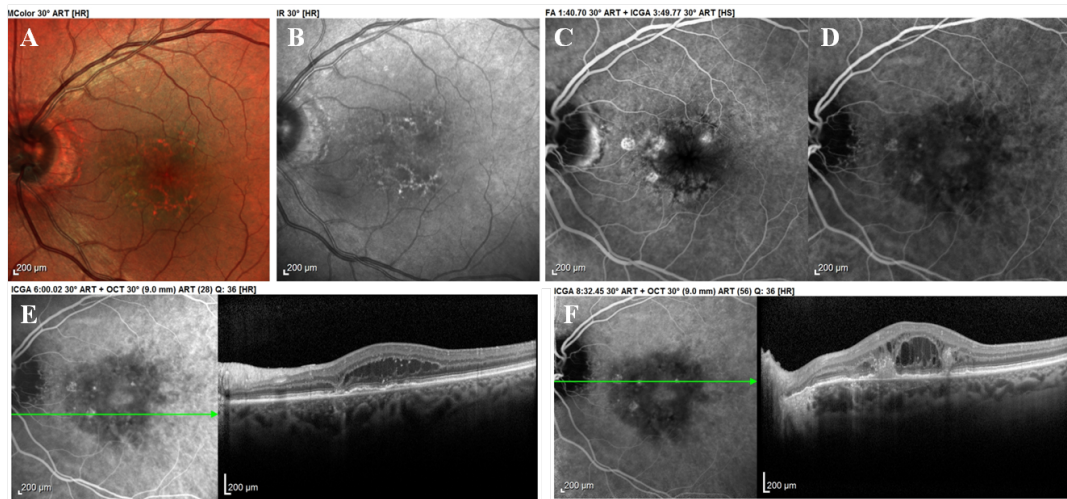


**Figura 1.25: Membrana neovascular tipo 2.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia” (A) Retinografía multicolor en que se observan cambios pigmentarios y un componente neovascular en el área macular. (B) AF de onda corta. (C) AGF en fase arteriovenosa y (D) AGF en fase venosa media en que se objetiva un patrón angiográfico de tipo clásico. (E) OCT donde se objetiva la presencia de un desprendimiento del neuroepitelio con quistes intrarretinianos.

*Proliferación angiomatosa retiniana:*

Este tipo de complejo neovascular es el responsable del 12 al 20 % de los casos de DMAE húmeda en poblaciones caucásicas [Marques et al. 2015] y es bilateral en el 100 % de las ocasiones a los 3 años [Gross et al. 2005]. Como estas lesiones se originan tanto desde la circulación retiniana como de la coroidea, nunca van a aparecer en la ZAF [Yannuzzi et al. 2001]. Se han descrito diferentes estadios en función de su evolución [Yannuzzi et al. 2001]. El estadio I se caracteriza por la presencia de edema intrarretiniano motivado principalmente por una anastomosis retino - retiniana; el estadio II acontece cuando la neovascularización intrarretiniana traspasa los fotorreceptores y llega al espacio subretiniano formando una neovascularización subretiniana. En este estadio es típica la presencia de LSR y pueden aparecer DEPs que tienen una tasa de ruptura similar al resto de lesiones neovasculares típicas [Cho et al. 2016] que se sitúa en torno al 8,2 % [Cho et al. 2015]. Finalmente, el estadio III se produce cuando se crea la anastomosis entre el componente neovascular coroideo y el retiniano. En un inicio responden muy bien al tratamiento con antiVEGF. Un subanálisis del estudio Comparison of Age - Related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) a dos años mostró mayores mejorías visuales en el primer año de tratamiento que el resto de lesiones [Daniel et al. 2016]. No obstante, en estadios más avanzados donde la anastomosis retino - coroidea ya está consolidada se hacen resistentes al tratamiento y conllevan peor pronóstico [Cho et al. 2016]. Además, es frecuente que este tipo de lesiones desarrollen AG [Baek et al. 2016; Marsiglia et al. 2015].

- Retinografía: Es típica la presencia de hemorragias intra o pretinianas en estadios iniciales o subretinianas en más avanzados, cambios pigmentarios y exudados lipídicos [Daniel et al. 2016]. Con respecto a las drusas, es típica la presencia de pseudodrusas reticulares [Marsiglia et al. 2015] y cuando el área de drusas grandes centrales es mayor de  $510,196 \mu^2$  el riesgo de neovascularización en el ojo adelfo es mayor [Marques et al. 2015].
- Tomografía de coherencia óptica (OCT): En estadios iniciales es típica la presencia de una hiperreflectividad focal intrarretiniana junto con atrofia del EPR y los fotorreceptores [Querques et al. 2013]. El signo de exudación inicial más frecuente es la presencia de quistes intrarretinianos. Conforme progresa la neovascularización es posible encontrar otras formas de exudación como el desprendimiento neurosensorial o la presencia de DEPs de morfología trapezoidal o cupuliformes [Kim et al. 2016a]. Otro signo característico de las membranas tipo RAPs es la presencia de una atrofia o adelgazamiento coroideo [Kim et al. 2016a; Marsiglia et al. 2015] que se hace más patente con el tratamiento.



**Figura 1.26: Membrana neovascular tipo 3 o RAP.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia” (A) Retinografía multicolor en que se observan cambios pigmentarios en el área macular. (B) AF de onda corta. (C) AGF en fase arteriovenosa y (D) AVI en que se objetiva la presencia de puntos calientes hiperfluorescentes. (E) y (F) OCT donde se objetiva la presencia de quistes intrarretinianos y una pérdida de la capa nuclear externa.

- Angiografía con fluoresceína (AGF) / Angiografía con verde de indocianina (AVI): En la AGF se visualiza una zona de hiperfluorescencia focal intrarretiniana o una neovascularización de tipo oculto. El empleo del AVI muestra puntos calientes únicos o múltiples [Yannuzzi et al. 2001].
- Angiografía con tomografía de coherencia óptica (angio - OCT): Se objetivan pequeños complejos neovasculares intrarretinianos en comunicación con el plexo capilar profundo retiniano [Kuehlewein et al. 2015].

#### *Membrana neovascular tipo mixta:*

Se denomina así al subtipo de membrana formado por 2 o más tipos de procesos neovasculares diferentes como sucede por ejemplo en casos en que encontramos NVC tanto por encima como por debajo del EPR (combinación de NVC tipo 1 y NVC tipo 2) o en combinaciones de NVC tipo RAP con áreas de NVC tipo 1 [Freund et al. 2010]. Su incidencia se estima en torno al 9.8 % y el 16.9 % de los casos y depende en gran medida de la sensibilidad de las pruebas diagnósticas empleadas [Jung et al. 2014].

- Retinografía: Al constituir una mezcla de diferentes tipos neovasculares sus hallazgos pueden ser muy variables. En concordancia con las NVC tipo 2 se ha visto que este tipo de lesiones desarrollan en gran medida cicatrices fibrosas disciformes [Mrejen et al. 2015; Schmidt-Erfurth et al. 2016]

- Tomografía de coherencia óptica (OCT): Es posible objetivar signos más típicos de NVC tipo 1 como el LSR o la presencia de DEP, así como cuando coexiste con una NVC tipo 2 o con un RAP es posible apreciar la quistes interretinianos, producto del proceso neovascular por encima del EPR y de la alteración en las capas externas de la retina [Freund et al. 2010].
- Angiografía con fluoresceína (AGF) / Angiografía con verde de indocianina (AVI): Tanto en la AGF como en el AVI es posible encontrar la combinación de varios patrones de fluorescencia ya sean ocultos o clásicos, en función de los subtipos neovasculares que la conformen.
- Angiografía con tomografía de coherencia óptica (angio - OCT): Es posible encontrar el complejo neovascular tanto por encima como por debajo del EPR.

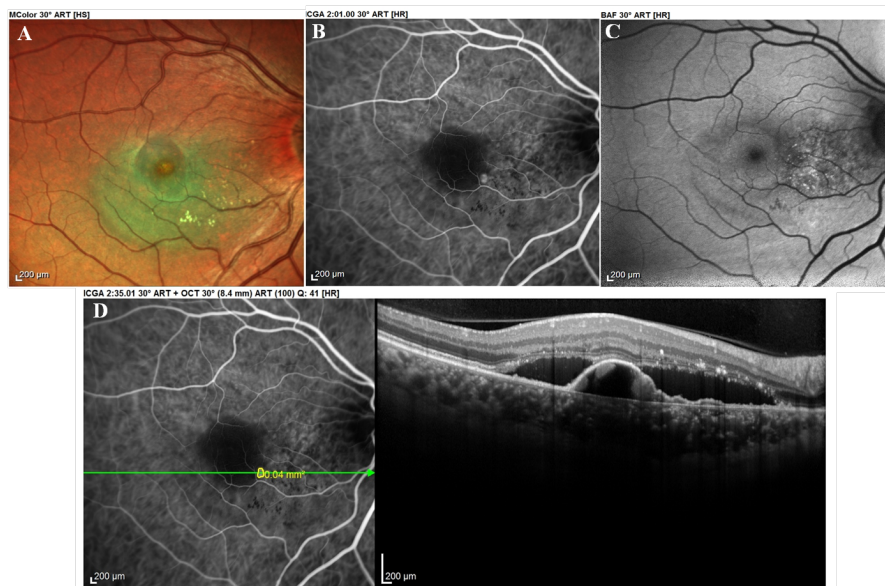
*Vasculopatía polipoidea:*

La VCP es una patología caracterizada por el crecimiento de vasos coroideos formando una trama vascular con dilataciones aneurismáticas y polipoideas [Liu et al. 2016]. Es, al igual que el resto de lesiones neovasculares, una causa de exudación macular; no obstante, existe controversia en cuanto a si se considera un subtipo de DMAE exudativa o una entidad clínica diferente [Wong et al. 2016]. Aunque comparte algunas bases moleculares y factores genéticos y ambientales con la DMAE, la VCP presenta diferencias epidemiológicas, clínicas, histopatológicas y de respuesta a antiVEGF [Coscas et al. 2015c; Wong et al. 2016]. Coscas y colaboradores [Coscas et al. 2015c] consideran que sería conveniente diferenciar las DMAEs típicas en que puedan haber neovasos con dilataciones de tipo pólipo de la VCP en sí misma.

- Retinografía: Lo más llamativo es la presencia de uno o más nódulos anaranjados en el área macular o peripapilar que se corresponden con las dilataciones polipoidales. Además, la presencia de DEPs hemorrágicos o exudados lipídicos nos deben hacer pensar en esta entidad [Wong et al. 2016].
- Tomografía de coherencia óptica (OCT): Se han descrito hallazgos típicos en la SD - OCT que incluyen la presencia de DEPs abruptos y con muescas, con un contenido hiporreflexivo en el que se puede visualizar una estructura redondeada hiperreflectiva con lumen que se corresponde con el pólipo. Además del DEP, otros signos son «el signo de la doble línea» que corresponde con la trama vascular y hace referencia a una separación entre el EPR y la membrana de Bruch, y los «pólipos en huella de pulgar» correspondientes a la

impronta del pólipo sobre el EPR [Wong et al. 2016]. La presencia de 2 de estos 3 signos hace que la especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de VCP se sitúen en torno al 90 % [Liu et al. 2016].

- Angiografía con fluoresceína (AGF) / Angiografía con verde de indocianina (AVI): En la AGF se ven como membranas de tipo oculto generalmente indiferenciadas. No obstante, el AVI constituye el *gold - standard* y confirma el diagnóstico. Se visualizan en los primeros 6 minutos del angiograma uno o más puntos nodulares hiperfluorescentes correspondientes con los pólipos [Wong et al. 2016]. Se puede visualizar o no la pulsatilidad del pólipo así como la trama vascular [Tan et al. 2016b].
- Angiografía con tomografía de coherencia óptica (angio - OCT): La VCP puede presentar numerosos patrones en la angio - OCT debido a que el flujo vascular dentro de las dilataciones polipoideas muchas veces está comprometido [Wang et al. 2016b]. Los pólipos pueden verse como zonas hiperreflectivas en el borde de la lesión retiniana [Kim et al. 2016b] o como estructuras hiporreflectivas por la ausencia de flujo vascular [Inoue et al. 2015]. La trama vascular se visualiza con mayor facilidad mostrando una imagen en medusa o en abanico [Wang et al. 2016b].



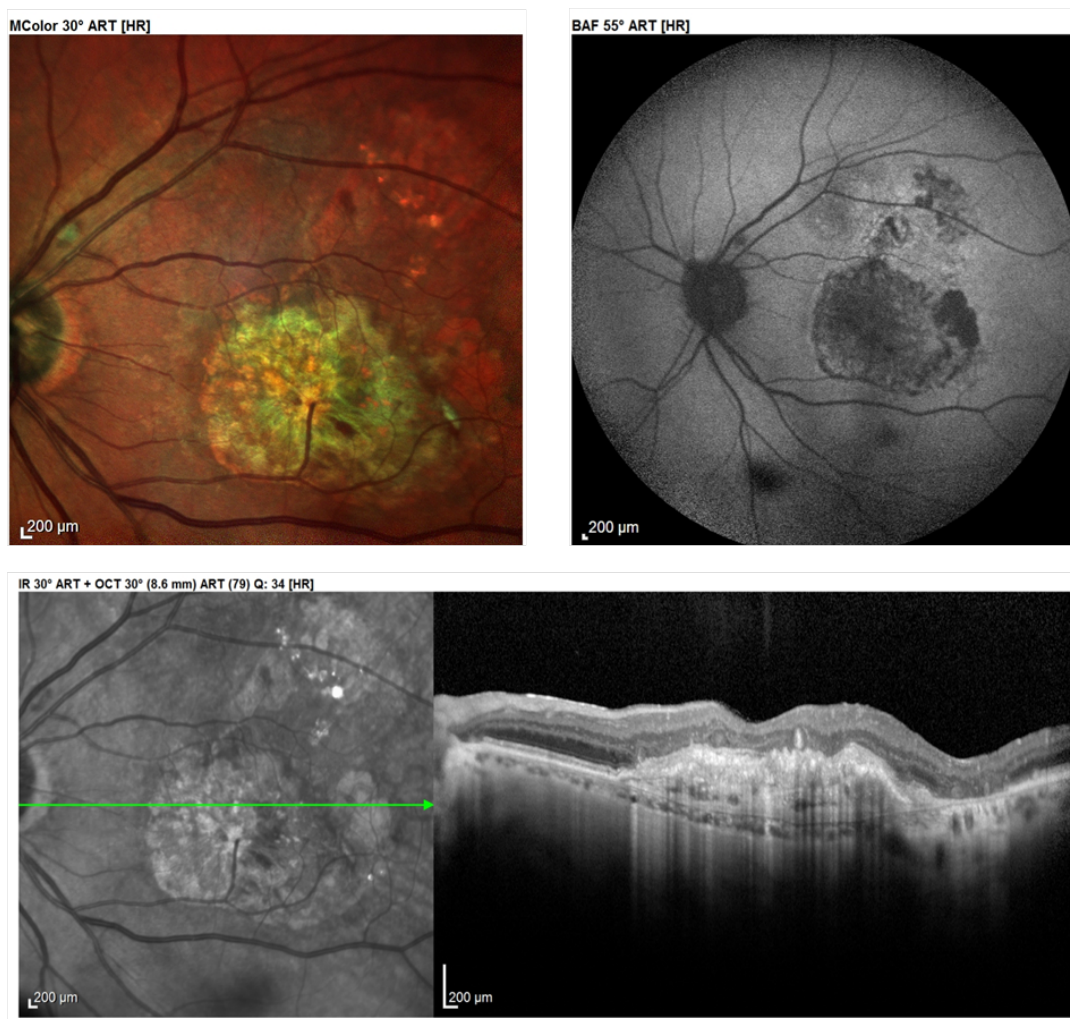
**Figura 1.27: Membrana neovascular tipo VCP.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia” (A) Retinografía multicolor en que se observan cambios pigmentarios y un componente exudativo lipídico en el área macular. (B) AVI en que se observa la presencia de un punto caliente hiperfluorescente (C) AF de onda corta con cambios hiper / hipoafluorescentes peripapilares. (D) Correlación entre AVI y OCT donde se objetiva la presencia de un DEP con estructuras hiperreflectivas en su interior y un desprendimiento del neuroepitelio.

### **Cicatriz disciforme:**

Las cicatrices disciformes o fibrosis subfoveal constituyen el estadio final de la DMAE (Figura 1.28). La evolución normal del tejido neovascular pasa por una fase de proliferación, otra de involución y, finalmente, termina en la fibrosis. Antes del inicio de tratamiento con fármacos antiVEGF, las cicatrices disciformes acontecían en el 40 % de los casos y eran de gran tamaño lo que conllevaba un mal pronóstico visual [Green et al. 1993]. Cifras del estudio CATT nos muestran que la incidencia de este tipo de lesiones ha bajado al 18 % [Daniel et al. 2014]. El tratamiento precoz con fármacos antiVEGF disminuye la duración de la etapa de proliferación y estabilizan el proceso neovascular en el tiempo; esto consigue que las cicatrices disciformes, en caso de formarse, sean de menor tamaño [Daniel et al. 2014; Ryu et al. 2016].

En la retinografía las cicatrices disciformes se visualizan como una lesión blanquecina o amarillenta de aspecto fibroso localizada en el área macular. En la SD - OCT se visualiza como una cicatriz fibrovascular laminar hiperreflectiva que puede asociar hendiduras hiporreflectivas dentro de la retina neurosensorial no indicativas de exudación activa [Ryu et al. 2016]. En la AGF se objetiva como un área de hiperfluorescencia bien delimitada que no exuda en tiempos tardíos.

En función de donde se localicen las cicatrices disciformes con respecto al EPR se distinguen dos patrones pronósticos diferentes [Ryu et al. 2016]. Aquellas que se localizan por debajo del EPR presentan mejor AV pues el EPR intacto ayuda a preservar la integridad de la MLE y la ZE. Por el contrario, cuando la cicatriz disciforme se forma por encima del EPR la visión es peor. En este segundo tipo de lesiones es más frecuente la presencia de tubulaciones de la retina externa [Ryu et al. 2016] que suponen un indicio de disrupción y alteración de la retina externa y de los fotorreceptores [Zweifel et al. 2009].



**Figura 1.28: Cicatriz disciforme.** Fuente: “Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia” (A) Retinografía multicolor en que se observan un componente fibrótico cicatricial en el área macular. (B) AF de onda corta que muestra adyacente a la cicatriz disciforme un área de AG (⊗). (C) OCT donde se objetiva la presencia de una desestructuración de las capas externas de la retina y del desprendimiento del epitelio pigmentario subfoveales. Nótese el área de atrofia que en la OCT se visualiza con una hipertransmisibilidad de la coroides (⊗).

### 1.4.6 Diagnóstico

#### *Retinografía en la degeneración macular asociada a la edad*

La retinografía ha constituido la prueba *gold - standard* para la realización de un cribado de DMAE [Kanagasingam et al. 2014]. Al proporcionarnos una imagen a color del fondo de ojo nos permite además:

- **Detección y cuantificación de drusas y de cambios pigmentarios:** Estas alteraciones constituyen los signos de inicio de la DMAE [Ferris et al. 2013; Khan et al. 2016].

Su detección nos va a permitir diferenciar el envejecimiento normal de fondo de ojo de la DMAE inicial seca.

- **Clasificación y gradación de la DMAE:** Como hemos comentado, las principales clasificaciones se basan en los hallazgos de retinografía.
- **Identificación de AG:** El método tradicional para la detección de la AG era la retinografía. Aunque recientes estudios han objetivado que la AF detecta alteraciones con mayor precocidad, ambas técnicas se igualan en DMAE con AG evolucionada [Domalpally et al. 2016]. El empleo de técnicas de imagen multicolor mejora la detección de estas lesiones [Ben Moussa et al. 2015].
- **Visualización de signos de sospecha de DMAE neovascular y diferenciación en subtipos:** La presencia de DEPs, hemorragias o exudados lipídicos nos deben poner en alerta ante la sospecha de un crecimiento neovascular. Las características fundoscópicas en el ojo contralateral nos pueden servir para la diferenciación en subtipos de membranas neovasculares [Gallego-Pinazo et al. 2016]; así mismo, la presencia de determinadas alteraciones como las hemorragias peripapilares, los nódulos anaranjados o los DEPs hemorrágicos en el caso de la VCP [Wong et al. 2016] o el desarrollo de la AG en el caso de membranas tipo RAP [Marsiglia et al. 2015] pueden ser útiles para la diferenciación.
- **Cribado y estrategias de telemedicina:** Como acabamos de comentar, la retinografía constituye la técnica de elección para la realización de un cribado de DMAE. Esto ha permitido que mediante esta técnica se puedan constituir herramientas de telemedicina para un diagnóstico precoz, ya sea de forma automatizada [Phan et al. 2016] o mediante el análisis por especialistas no retinólogos [Duchin et al. 2015]. Mediante estas estrategias de diagnóstico a distancia no se ha objetivado retraso en el inicio de tratamiento de formas naive; sin embargo, parece haber un pequeño retraso del retratamiento en el caso de recurrencias [Li et al. 2015].

### *Tomografía de coherencia óptica en la degeneración macular asociada a la edad*

El empleo de la OCT ha supuesto una revolución en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la DMAE. El aumento de la resolución en las imágenes en las distintas capas de la retina, junto a la facilidad de la realización de la prueba y al carácter no invasivo de la misma la han convertido en la principal herramienta diagnóstica en esta patología. Junto con el examen de la AV y del fondo de ojo, la exploración con OCT se considera esencial en las consultas de retina especializadas en DMAE. Dentro de los usos aplicados a la DMAE destacan:

- **Diagnóstico de la DMAE y herramienta de diferenciación de formas secas vs formas exudativas:** El examen con OCT proporciona la posibilidad de objetivar alteraciones retinianas y coroideas propias de la DMAE. Así mismo, permite el diagnóstico de membranas neovasculares activas incluso antes de ser sintomáticas [Schmidt-Erfurth et al. 2016].
- **Diferenciación de subtipos de neovascularización coroidea:** Como hemos comentado, en 2010 Freund et al, [Freund et al. 2010] propuso una nueva clasificación de los tipos de DMAE exudativa basada en la OCT. Estudios recientes han demostrado que el estudio combinado mediante angiografía y OCT aumenta la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de los diferentes tipos de neovascularización coroidea [Gallego-Pinazo et al. 2016]; hecho que se pone aún más de manifiesto en las membranas neovasculares tipo RAP donde el examen con OCT aumenta la frecuencia diagnóstica [Jung et al. 2014].
- **Seguimiento y evolución de parámetros de exudación activa:** La presencia de líquido intra o subretiniano propio de la alteración de la permeabilidad en la neovascularización coroidea activa en muchas ocasiones puede resultar asintomática y pasar desapercibida en el examen de fondo de ojo. Su detección precoz en la actualidad se considera esencial y muchas estrategias de tratamiento de la DMAE lo consideran un factor de actividad que indica la necesidad de un tratamiento de forma precoz [Kanagasingam et al. 2014; Schmidt-Erfurth et al. 2016].
- **Localización y diferenciación de drusas:** Mediante el examen con OCT es posible distinguir el tipo y tamaño de las drusas [Khan et al. 2016] y de los depósitos subretinianos [Zweifel et al. 2010].
- **Evaluación del estado de retina externa (MLE, ZE, COST y EPR) y de retina interna:** En los últimos años se han intentado encontrar factores pronósticos que puedan

alterar el pronóstico visual de la DMAE [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Mediante el examen con OCT es posible determinar el estado de la retina neurosensorial y del EPR, hecho que ha servido para el estudio de la influencia de las distintas capas en la AV final [Akagi-Kurashige et al. 2012; Schmidt-Erfurth et al. 2016].

- **Evaluación y seguimiento de AG:** Con la OCT es posible diferenciar áreas de adelgazamiento retiniano asociadas con hiperfluorescencia coroidea de inicio abrupto, típicas de la AG [Fleckenstein et al. 2008]. El seguimiento del crecimiento de estas áreas también es posible hacerlo con el análisis tomográfico valorando el adelgazamiento de la plexiforme externa, la pérdida de la MLE y la hiperreflectividad coroidea aumentada [Chaikitmongkol et al. 2016]. Además, permite identificar alteraciones como la presencia de tubulaciones retinianas externas [Hariri et al. 2015] o un engrosamiento de la nuclear interna [Ebnetter et al. 2016] que se asocian con diferentes tasas de crecimiento de la AG [Chaikitmongkol et al. 2016; Ebnetter et al. 2016; Hariri et al. 2015].
- **Evaluación de cambios en el grosor coroideo:** Los distintos dispositivos de OCT y en especial aquellos especializados en la visualización de las estructuras más profundas, nos permiten valorar los cambios producidos en el grosor coroideo [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Este parámetro generalmente se cuantifica mediante la medida de la distancia entre la línea hiperreflectiva correspondiente con el EPR y la interfaz escleral [Mrejen et al. 2013].

### *Angiografía con fluoresceína en la degeneración macular asociada a la edad*

La clasificación de la DMAE más empleada en los ensayos clínicos ha sido la propuesta en 1991 por el MPS que se realizaba en base a los hallazgos en la AGF [Group 1991]. Este grupo de expertos pretendía evaluar el efecto del tratamiento láser en los diferentes tipos de neovascularización. Para la diferenciación en subtipos se basó en el patrón angiográfico que presentaban diferenciando en (1) membranas neovasculares predominantemente clásicas, (2) membranas neovasculares mínimamente clásicas y (3) membranas neovasculares ocultas.

En la actualidad, la AGF en la DMAE se reserva para detectar exudación activa, cuantificar el tamaño de la neovascularización [Dirani et al. 2015], hacer el diagnóstico diferencial con otras patologías retinianas y, en contadas ocasiones, como guía de tratamiento láser [Ladas et al. 2012]. Su utilidad en la diferenciación de subtipos neovascularización persiste, pero normalmente se hace un análisis combinado de las imágenes obtenidas mediante angiografía y OCT lo que aumenta la sensibilidad y la especificidad diagnóstica [Gallego-Pinazo et al. 2016].

### *Angiografía con verde de indocianina en la degeneración macular asociada a la edad*

Aunque la AVI es menos utilizada en la práctica clínica habitual que la AGF en pacientes con sospecha de exudación macular, es una prueba que puede aportar gran información en la DMAE. Entre sus principales utilidades se encuentran [Fernandes et al. 2002; Stanga et al. 2003]:

- **Visualización de áreas de isquemia coroideas:** Las zonas de isquemia coroidea se han considerado como uno de los principales sustratos etiopatogénicos de la DMAE exudativa [Goldberg et al. 1998. Con el AVI estas zonas se pueden visualizar y cuantificar.
- **Estudio y visualización de membranas neovasculares de tipo oculto:** En muchas ocasiones la DMAE exudativa puede asociar el acúmulo de fluido, sangre o DEPs de la retina que dificultan la visualización de la neovascularización subyacente. La mayor fluorescencia del AVI permite la identificación de este tipo de membranas lo que puede ser útil para el diagnóstico, el seguimiento y el tratamiento de las mismas.
- **Identificación de VCP:** Aunque las dilataciones polipoidales coroideas propias de esta patología en ocasiones pueden ser visualizadas con el examen de fondo de ojo, suele ser necesario el examen con AVI para su diagnóstico [Wong et al. 2016. Con AVI es posible visualizar el componente polipoideo y, en ocasiones, la trama vascular asociada, pudiendo presentarse como una placa o como un punto hiperfucsiano [Wong et al. 2016]. Esta prueba se realiza también para comprobar el cierre del componente polipoideo y como guía de tratamiento con láser de terapia fotodinámica [Koh et al. 2013; Wong et al. 2016].
- **Identificación de membranas tipo RAP:** Este tipo de membranas surgen de una anastomosis inicialmente retino - retiniana que en estadios avanzados pasa a ser retino - coroidea. Su examen con AGF nos devuelve la imagen de una membrana neovascular oculta siendo de gran dificultad diferenciar este subtipo de membrana. No obstante, su estudio con AVI permite la visualización en fases medias y tardías de la neovascularización la cual generalmente se presenta como un punto caliente hiperfucsiano. Como hemos comentado previamente, a diferencia de la VCP, en el RAP no se produce lavado del colorante del punto caliente en fases tardías del examen [Yannuzzi et al. 2001].
- **Diagnóstico diferencial con otras patologías:** Patologías como la coriorretinopatía serosa central [Shiraki et al. 1997, el hemangioma coroideo [Karimi et al. 2015] o ma-

cronaurismas retinianos [Kim et al. 2015] también pueden producir exudación en el área macular siendo de gran importancia pronóstica y terapéutica su diferenciación con formas exudativas de la DMAE.

### *Autofluorescencia en la degeneración macular asociada a la edad*

La AF es una de las pruebas más importantes en el estudio de la DMAE. La fisiopatología de la DMAE todavía resulta desconocida, sin embargo el estado del EPR parece constituir un factor clave para su desarrollo. Por ello, no es extraño pensar que la AF en la DMAE tiene numerosas utilidades entre las que se encuentran [Batioglu et al. 2015]:

- **Clasificación y diagnóstico:** En estadios iniciales de DMAE, muchas veces los hallazgos fundoscópicos y angiográficos no presentan correlación real con las imágenes de AF. Por ejemplo, algunos casos como las drusas pueden ser visibles en el fondo de ojo y no en la AF mientras que otros casos, como en la pseudodrusas reticulares, son prácticamente invisibles en el fondo de ojo y es necesaria la AF para determinar su presencia. No obstante, en 2005 el grupo de estudio de la AF estableció 8 diferentes patrones para la DMAE inicial [Bindewald et al. 2005]. En la mayoría de ojos, es posible diferenciar un único patrón, no obstante existen casos en que estos patrones se pueden combinar. La descripción de estos patrones resulta de gran interés pues se ha visto que los patrones focales evolucionan con mayor frecuencia hacia la AG mientras que el patrón parcheado es más frecuentemente visto en casos con desarrollo posterior de neovascularización [Batioglu et al. 2015].
- **Detección de áreas de AG:** Uno de los estadios de DMAE avanzada es la AG. En 2007, Holz y colaboradores [Holz et al. 2007] estudiaron la AF de áreas cercanas a las zonas de AG ya establecida en pacientes con DMAE avanzada intentando investigar si diferentes patrones podrían estar relacionados con una mayor o menor velocidad de crecimiento del área de atrofia.
- **Valoración de la DMAE exudativa:** A diferencia de en pacientes con DMAE de tipo atrófico, en los casos de la DMAE exudativa las imágenes con AF pueden ser normales o presentar mínimas alteraciones.
- **Información sobre la viabilidad del EPR y el potencial funcional:** La AF constituye una de las herramientas más empleadas para la valoración de posibles rupturas del EPR [Schmitz-Valckenberg et al. 2008]. También es una técnica muy útil para la valora-

ción de DEPs y para valorar la extensión de cicatrices disciformes [Kanagasingam et al. 2014].

- **Clasificación de subtipos de membranas neovasculares:** Aunque se ha intentado usar la AF para la clasificación en subtipos de la DMAE, los hallazgos pueden ser muy inespecíficos y difíciles de interpretar. No obstante, recientemente Ozkok y colaboradores [Ozkok et al. 2016] han descrito que la presencia de alteraciones peripapilares en la AF constituiría un hallazgo para sospechar una neovascularización polipoidea.
- **Información pronóstica:** Las imágenes de AF nos pueden dar información sobre el grado de afectación de un paciente con DMAE. Es posible identificar patrones de DMAE avanzada en su forma neovascular o en forma de área geográfica e identificar la afectación o no del área foveal. Además, determinados patrones de AF se han asociado a una mayor velocidad de crecimiento del área de AG siendo el patrón de tipo goteo difuso el que asocia una mayor tasa de progresión [Holz et al. 2007].

#### *Angiografía con tomografía de coherencia óptica en degeneración macular asociada a la edad*

La utilidad de la angio - OCT en la DMAE se basa en las posibilidades que presenta esta técnica de dar información tanto estructural como del flujo vascular sin la necesidad de la administración de un colorante. Dentro de ellas encontramos [Chalam et al. 2016]:

- **Diagnóstico de membranas neovasculares exudativas y no exudativas:** Permite la detección de complejos neovasculares que exudan como hace la AGF pero a diferencia de ella, también nos va a permitir diferenciar nuevas membranas neovasculares aun en ausencia de exudación activa [Palejwala et al. 2015].
- **Clasificación y subtipos de membranas neovasculares:** Los conocimientos en cuanto a los subtipos de membrana mediante esta técnica son cada vez mayores. Nos permite diferenciar si el complejo neovascular está por encima o por debajo del EPR [Coscas et al. 2015b] y se han descrito imágenes de membranas tipo 1 [Kuehlewein et al. 2015], tipo 2 [Souied et al. 2016], RAP [Kuehlewein et al. 2015] y VCP [Wang et al. 2016b]; sin embargo, la dificultad en la interpretación de los análisis hace que los datos distintivos sean poco fiables hasta la fecha [Chalam et al. 2016].

- **Cuantificación de parámetros de flujo en membranas neovasculares:** Esta técnica nos permite cuantificar el flujo vascular y el área de los complejos neovasculares [Jia et al. 2014].
- **Análisis del flujo en zonas de AG:** El estudio del flujo vascular retiniano y coroideo mediante esta técnica en zonas de AG ha revelado una reducción severa del flujo vascular coroideo en las zonas de atrofia y una reducción media del mismo en el área perilesional a la AG [Kvanta et al. 2016]. No se encontraron cambios a nivel del flujo intrarretiniano. Este parámetro podría servir para la monitorización en estudios clínicos.
- **Monitorización y seguimiento de la enfermedad:** Nos permite evaluar modificaciones de forma no invasiva en el complejo neovascular con el tratamiento. A las 24 horas del tratamiento con antiVEGF se produce una reducción del complejo neovascular y un estrechamiento de los vasos que lo forman [Lumbroso et al. 2015]. Además, como hemos comentado, nos va a permitir el diagnóstico de formas subclínicas [Palejwala et al. 2015].

## 1.5 El tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad exudativa

La DMAE neovascular acontece en un 10 - 15 % de todos los casos de DMAE, sin embargo, es la responsable del 90 % de los casos de pérdida visual severa en esta enfermedad [Frampton 2012]. En la DMAE neovascular, las células endoteliales de la coriocalilar migran hacia el EPR y la retina neurosensorial donde proliferan hasta formar membranas o complejos neovasculares [Wang et al. 2016a]. El VEGF ha sido identificado como el principal factor en este crecimiento vascular [Campochiaro 2015; Rubio et al. 2016]. Hasta la fecha la DMAE exudativa no tiene cura, pero el tratamiento con fármacos antiVEGF ha permitido controlar el curso natural de la enfermedad y mejorar el pronóstico visual [Maguire et al. 2016]; constituyendo en la actualidad el *gold - standard* para el tratamiento de esta patología [Agarwal et al. 2016].

### 1.5.1 Fármacos anti - factor de crecimiento del endotelio vascular

El papel del VEGF en el desarrollo de la neovascularización dio lugar a la creación de fármacos antiVEGF. Se han realizado numerosos ensayos clínicos para determinar la seguridad y la eficacia de este grupo de fármacos [Esen et al. 2016]. Como hemos comentado, estos fármacos han conseguido modificar el pronóstico de la enfermedad y aunque las ganancias visuales conseguidas en los primeros años puedan no mantenerse a largo plazo, la AV media a 5 años en el 50 % de los pacientes que han recibido tratamiento es  $\geq 20/40$  [Maguire et al. 2016]. El primero en surgir fue el pegabtanib en 2004 [Gragoudas et al. 2004]. Pese a un resultado favorable inicial, a largo plazo conllevaba pérdida visual [Ba et al. 2015]. En la actualidad los fármacos más frecuentemente empleados son el bevacizumab, el ranibizumab y el aflibercept.

#### *La familia del factor de crecimiento del endotelio vascular*

Los miembros de la familia VEGF y sus receptores desempeñan una función esencial en la formación y estabilidad de los vasos sanguíneos y linfáticos. Se han identificado cinco proteínas VEGF diferentes en humanos: VEGF - A, VEGF - B, VEGF - C, VEGF - D y el factor de crecimiento placentario (PIGF) [Papadopoulos et al. 2012]. Especialmente involucrados en la patógenesis de la neovascularización patológica ocular se encuentran el VEGF - A y el PIGF, que intervienen fundamentalmente en la inducción de la neovascularización ocular [Brown et al. 2011], y el VEGF - B, que actuaría como antiapoptótico [Li et al. 2009].

- **VEGF - A:** Se ha asociado al crecimiento patológico de nuevos vasos sanguíneos frágiles en el ojo, junto con un incremento de la permeabilidad vascular [Brown et al. 2011]. Se han identificado diversas isoformas del VEGF - A con diferentes actividades biológicas [Hoeben et al. 2004; Olsson et al. 2006; Papadopoulos et al. 2012], siendo la isoforma VEGF - 165 la de mayor expresión en humanos [Papadopoulos et al. 2012].
- **PIGF:** Desempeña una función importante en la angiogénesis patológica [Sadiq et al. 2016]. Entre los mecanismos que explicarían su papel se incluiría, por un lado, la activación directa del receptor VEGFR - 1 , favoreciendo el reclutamiento de células inflamatorias y continuando con el ciclo de angiogénesis e inflamación [Brown et al. 2011]; y por otro lado, interactuando con el VEGF - A, y favoreciendo su desplazamiento a los receptores VEGFR - 2 [Sadiq et al. 2016].

- **VEGF - B:** Estudios clínicos en modelos animales han demostrado que, además de su función antiapoptótica, el tratamiento dirigido al VEGF - B inhibe la angiogénesis patológica al suprimir la supervivencia de los vasos sanguíneos [Papadopoulos et al. 2012].
- **Receptores del VEGF:** Los receptores del VEGF forman parte de los receptores tirosina kinasa, y se expresan principalmente en el sistema vascular, aunque también se han detectado en células no endoteliales [Olsson et al. 2006]. Hay tres tipos de receptores el VEGFR - 1, el VEGFR - 2 y el VEGFR - 3 [Hoeben et al. 2004; Papadopoulos et al. 2012]. Aunque el VEGF - A se va a unir con más afinidad al VEGFR - 1 [Terman et al. 1994], la actividad tirosina kinasa que produce su activación es muy baja por lo que la actividad angiogénica y, en general, los efectos de todas las isoformas del VEGF - A van a estar mediados principalmente por el VEGFR - 2 [Hoeben et al. 2004; Holash et al. 2002; Papadopoulos et al. 2012]. El VEGFR - 3 presenta su principal papel en el sistema linfático y sus ligandos son únicamente el VEGF - C y el VEGF - D [Hoeben et al. 2004]. A diferencia del VEGF - A que se une tanto al VEGFR - 1 como al VEGFR - 2, el VEGF - B y el PlGF solo se unen al VEGFR - 1 [Iyer et al. 2010]. Este receptor, el VEGFR - 1, además de actuar de forma directa mediante la unión de los ligandos VEGF, puede actuar de forma indirecta atrapando el VEGF y modificando por tanto la disponibilidad del VEGF para unirse al VEGFR - 2 [Iyer et al. 2010].

### ***Pegabtinib***

Pegaptanib fue el primer antiVEGF aprobado para el tratamiento de la DMAE húmeda [Gragoudas et al. 2004]. Es un aptámero selectivo para VEGF - A165 pero no tiene efecto sobre VEGF - A121 [Papadopoulos et al. 2012]. En ensayos clínicos iniciales pegabtinib mostró un modesto efecto en cuanto a enlentecer la pérdida visual en pacientes con DMAE [Gragoudas et al. 2004; Papadopoulos et al. 2012]. En la actualidad, algunos autores lo han descrito como efectivo en el tratamiento de mantenimiento de pacientes previamente tratados con otros antiVEGF [Inoue et al. 2015].

### ***Bevacizumab***

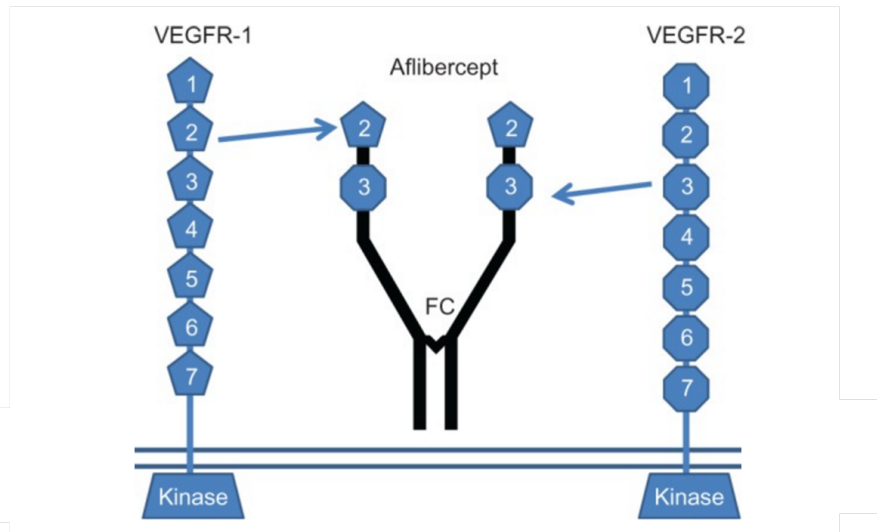
Es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante contra todas las isoformas del VEGF - A con efectos antiangiogénicos, aprobado para distintas indicaciones oncológicas [Ferrara et al. 2004], que se utiliza fuera de ficha técnica en la población con DMAE exudativa [Maguire et al. 2016; Martin et al. 2012; Papadopoulos et al. 2012].

### ***Ranibizumab***

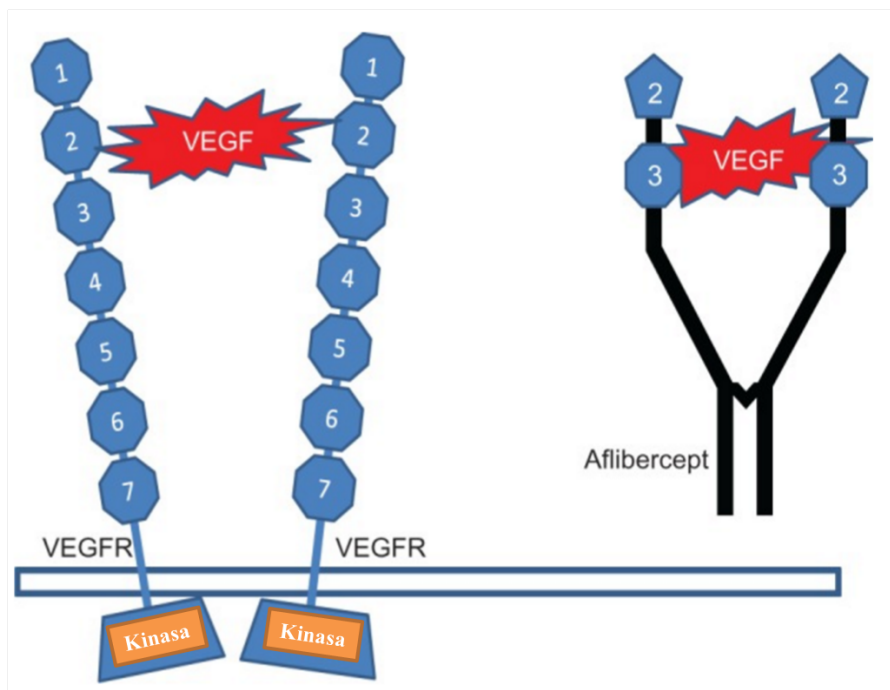
Ranibizumab constituye un fragmento de anticuerpo monoclonal anti - VEGF - A, derivado del mismo anticuerpo original que bevacizumab, pero sin la fracción cristalizable, indicado para el tratamiento de la DMAE exudativa, edema macular diabético, edema macular secundario a oclusiones vascular venosa de la retina, central y de rama, y el tratamiento de la alteración visual debida a la neovascularización coroidea secundaria a la miopía patológica. Se diseñó para tener una semivida sistémica más corta, una mayor afinidad de unión a las isoformas del VEGF, una mejor penetración en la retina (al tener menor peso molecular) [Papadopoulos et al. 2012] y una menor capacidad inflamatoria que bevacizumab [Kovach et al. 2012]. Los estudios pivotaes, *Minimally Classic/Occult Trial of the Anti - VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of wAMD* (MARINA) y *Anti - VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD* (ANCHOR) mostraron su eficacia en el tratamiento de la DMAE mediante inyecciones mensuales. Se encontraron ganancias a 12 meses de 6.5 - 7.2 letras ETDRS en el MARINA [Rosenfeld et al. 2006] y de 8.5 - 11.3 letras ETDRS en el ANCHOR [Brown et al. 2006].

### **1.5.2 Afibercept**

Afibercept, o como antiguamente se denominaba, VEGF Trap - Eye [Holash et al. 2002], está formado por el segundo dominio extracelular del VEGFR - 1 y el tercer dominio extracelular del VEGFR - 2 fusionado a la porción cristalizable de la inmunoglobulina G1 [Frampton 2012; Holash et al. 2002; Papadopoulos et al. 2012] (Figura 1.29). Actúa como un falso receptor soluble, que se une a todas las isoformas de VEGF - A, PlGF y VEGF - B [García-Layana et al. 2015; Papadopoulos et al. 2012] formando un tipo de complejo muy estable con el VEGF, como si lo atrapara [Frampton 2012] (Figura 1.30). Su estructura evita la formación de los inmunocomplejos característicos que forma el bevacizumab [MacDonald et al. 2016].



**Figura 1.29: Aflibercept.** Fuente: Figura sacada de “*Aflibercept in wet AMD: specific role and optimal use.*”; Semeraro y colaboradores [Semeraro et al. 2013].



**Figura 1.30: Mecanismo de unión al VEGF de aflibercept.** Fuente: Figura sacada y traducida de “*Aflibercept in wet AMD: specific role and optimal use.*”; Semeraro y colaboradores [Semeraro et al. 2013].

La Unión Europea recomienda su administración mediante 3 inyecciones mensuales de dosis de carga seguidas de una administración cada 8 semanas durante el primer año. A partir de los 12 meses el intervalo entre inyecciones puede prolongarse dependiendo de las condiciones anatómicas y funcionales de cada paciente [Schmidt-Erfurth et al. 2014b]. Los estudios pivotaes *The Vascular Endothelial Growth Factor VEGF Trap - Eye: Investigation of Efficacy and Safety in Wet AMD* (VIEW) 1 y 2 [Heier et al. 2012] demostraron que el fármaco administrado cada 2 meses después de una dosis de carga es equivalente a ranibizumab administrado mensualmente, en cuanto a ganancia de la AV y a reducción del grosor central retiniano.

### *Mecanismo de acción*

Aflibercept actúa como un falso receptor que se une al VEGF - A, VEGF - B y al PIGF con mayor afinidad que sus receptores naturales [Papadopoulos et al. 2012]; de manera que aflibercept bloquea de manera eficaz la unión y activación por parte del VEGF de estos receptores. Además, aflibercept se une al VEGF - A con mayor afinidad y de forma más rápida que ranibizumab o bevacizumab [Frampton 2012; Papadopoulos et al. 2012]. Tras su administración intravítrea, aflibercept se absorbe lentamente desde el ojo a la circulación sistémica. En la sangre aflibercept puede estar en forma de fármaco libre o más frecuentemente formando un complejo estable e inactivo con el VEGF [Frampton 2012]. Únicamente la forma «aflibercept libre» es capaz de unirse al VEGF endógeno [Frampton 2012]. En modelos animales se ha visto que la concentración plasmática máxima media de aflibercept libre es, aproximadamente, de 50 a 500 veces menor que la concentración de aflibercept necesaria para inhibir en un 50 % la actividad biológica del VEGF sistémico y las concentraciones plasmáticas de aflibercept libre son indetectables a las dos semanas de la última dosis [Frampton 2012].

Debido a su mayor afinidad para el VEGF - A que otros antiVEGF, se piensa que su actividad biológica puede ser más duradera [Papadopoulos et al. 2012] y que, por lo tanto, un tratamiento bimensual sería comparable respecto al efecto de inhibición del VEGF a un tratamiento mensual con los otros antiVEGFs. Esto se ha comprobado de diferentes formas:

- Aplicando un modelo matemático: La duración del efecto de un fármaco depende por un lado, de la cantidad de fármaco presente, que depende a su vez del tiempo de vida media y del peso molecular; y por otro lado, de su afinidad por el ligando. Aflibercept presenta un peso molecular de 110 kDa, intermedio entre ranibizumab (48 kDa) y bevacizumab (148 kDa) y una semivida también intermedia [Stewart et al. 2008]. Si aplicamos un modelo

matemático es posible predecir la actividad biológica de aflibercept [Stewart et al. 2008] que se situaría en torno a los 2,5 meses [Schmidt-Erfurth et al. 2014a; Stewart et al. 2008].

- Medida de VEGF, VEGF - A y aflibercept libre en humor acuoso: Otra forma de elucidar su actividad biológica es mediante la medida de los niveles de VEGF libre en humor acuoso en pacientes con DMAE exudativa tratados con esta medicación [Celik et al. 2015; Fauser et al. 2014]. De media, las concentraciones de VEGF intraocular permanecieron por debajo de los límites detectables unas 10 semanas [Fauser et al. 2014]. Además, no se objetivaron cambios en los valores de VEGF - A ni de aflibercept libre detectados al pasar de un tratamiento mensual a uno bimensual [Celik et al. 2015].
- Medida del VEGF plasmático: Se ha visto que aflibercept disminuye la concentración plasmática de VEGF en la primera semana tras su administración [Roald et al. 2015]. Su semivida plasmática es de 18 días debido a la fracción cristalizable [Schmidt-Erfurth et al. 2014a].
- Parámetros clínicos: Como hemos comentado con anterioridad, los estudios pivotaes VIEW demostraron que tras una dosis de carga, aflibercept administrado cada 2 meses es equivalente en cuanto a ganancia de la AV y reducción del grosor central retiniano a ranibizumab administrado mensualmente [Heier et al. 2012]. En este mismo sentido, estudios experimentales recientes han correlacionado el tiempo de supresión de VEGF - A en humor acuoso con la actividad clínica encontrando un mayor tiempo de supresión del VEGF - A y de inactividad con aflibercept que con ranibizumab [Fauser et al. 2016]. Fauser y colaboradores [Fauser et al. 2016] han visto que la administración bimensual de aflibercept es suficiente para mantener el VEGF - A por debajo de los límites detectables, pero llama la atención que en ambos fármacos la clínica exudativa acontece incluso con el VEGF totalmente suprimido.

### ***Aflibercept en la degeneración macular asociada a la edad exudativa. Estudios pivotaes:***

Los estudios pivotaes de aflibercept son el VIEW 1 y el VIEW 2. Son estudios fase 3, randomizados, doble ciego, que comparaban diferentes dosis de aflibercept con ranibizumab. Se realizaron análisis a las 52 [Heier et al. 2012] y a las 96 semanas [Schmidt-Erfurth et al. 2014b] de tratamiento (Figura 1.31) y (Figura 1.32):

- En las primeras 52 semanas: Los grupos de tratamiento eran (1) aflibercept 0.5 mg cada 4 semanas; (2) aflibercept 2 mg cada 4 semanas; (3) aflibercept 2 mg cada 8 semanas con una dosis de carga de 3 inyecciones mensuales y (4) ranibizumab 0.5 mg cada 4 semanas. Este estudio demostró la no inferioridad con respecto al % de pacientes que mantenían AV (pérdida <15 letras desde la basal) de los grupos de aflibercept con respecto a ranibizumab 0.5 mg cada 4 semanas [Heier et al. 2012]. Se consiguió una ganancia media de 8.7 letras ETDRS en el grupo de ranibizumab, de 9.3 letras ETDRS en el grupo de aflibercept 2 mg cada 4 semanas y de 8.4 letras ETDRS en el grupo de aflibercept 2 mg cada 8 semanas tras una dosis de carga de 3 inyecciones mensuales.
- Entre la 52 y la 96 semanas: Los mismos grupos de tratamiento fueron tratados conforme a una pauta *pro re nata* (PRN) con inyecciones obligatorias cada 12 semanas. En concordancia con los resultados anteriores, este análisis objetivó que todos los grupos de aflibercept eran no inferiores a ranibizumab conforme a ganancia de visión y a no pérdida de la misma y que, además, el grupo de tratamiento bimensual conseguía estos resultados con 5 inyecciones menos [Schmidt-Erfurth et al. 2014b]. Las ganancias visuales fueron 7.9 letras ETDRS en ranibizumab, 6.6 letras ETDRS en 0.5 mg aflibercept y de 7.6 letras ETDRS en 2 mg de aflibercept cada 4 semanas y cada 8 semanas.

La media total de inyecciones fueron 16.5 en el grupo de ranibizumab, 16 en aflibercept 0.5 mg, 16.2 en aflibercept 2 mg cada 4 semanas y 11.2 en aflibercept 2 mg cada 8 semanas. Subanálisis recientes de estos estudios han reflejado, además, que aflibercept resulta superior a ranibizumab en cuanto a cambios morfológicos: presenta mejores resultados en la reducción de la elevación del EPR y en la eliminación del FIR y del LSR [Garcia-Layana et al. 2015; Schmidt-Erfurth et al. 2014a].

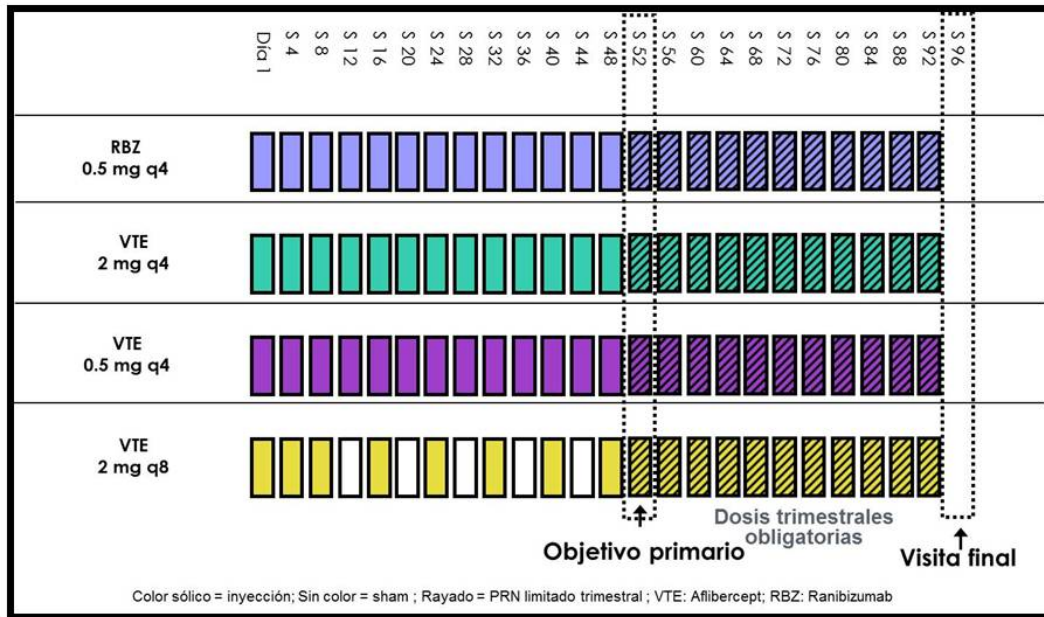


Figura 1.31: Protocolo de tratamiento de estudios VIEW. Fuente: Figura basada y traducida de "Presentación realizada por Edoardo Midena Clinica Oculistica Università di Padova." Disponible online en <http://slideplayer.com/slide/3332014/>

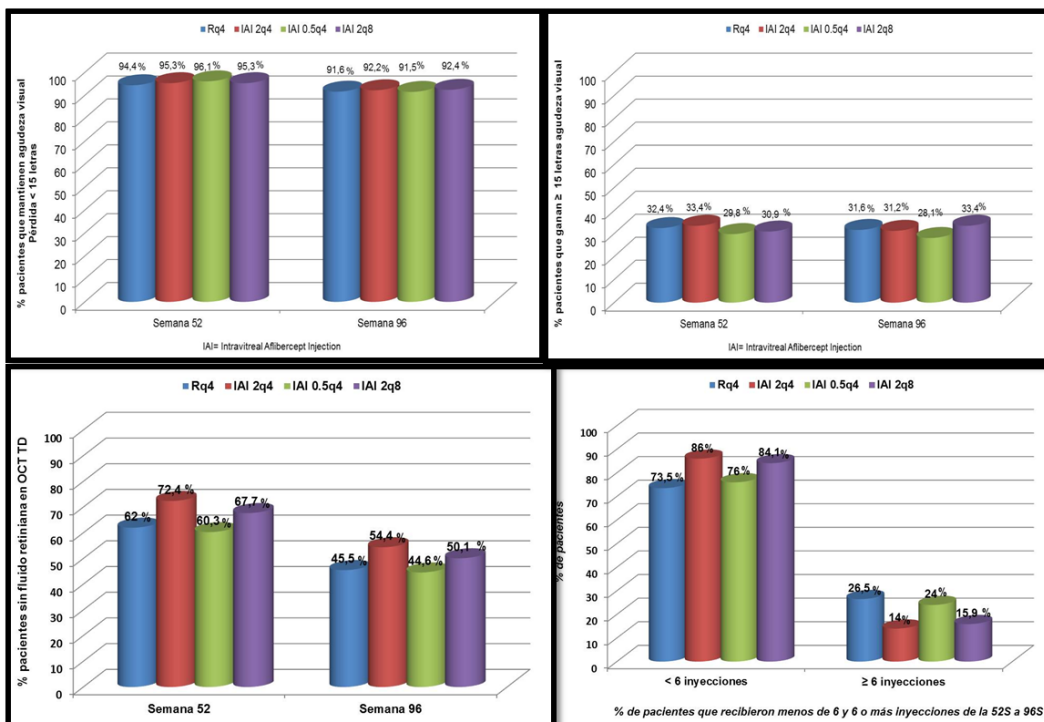


Figura 1.32: Principales resultados de estudios VIEW. Fuente: "Colección propia, Hospital General Universitario de Valencia." Ranibizumab 0.5 mg cada 4 semanas (Rq4), afibercept 0.5 mg cada 4 semanas (IAI 0.5q4); afibercept 2 mg cada 4 semanas (IAI 2q4); afibercept 2 mg cada 8 semanas (IAI 2q8).

***Aflibercept en la degeneración macular asociada a la edad exudativa. Práctica clínica real:***

Aflibercept y ranibizumab constituyen los dos únicos antiVEGF aprobados por la "Food and Drug administration" para el tratamiento de la DMAE exudativa. En la actualidad, con las palabras clave "Aflibercept" y "Exudative age - related macular degeneration" desde enero - 2010 hasta agosto - 2016 se pueden encontrar hasta 417 entradas en *PubMed* que hacen referencia a los resultados obtenidos por distintos autores en el tratamiento de esta patología con aflibercept; ya sea en pacientes en que aflibercept se ha usado como primera intención (pacientes naive) o en pacientes refractarios o no respondedores a tratamientos previos con otros antiVEGF en que se ha usado como fármaco de segunda intención. En general, la mayoría de los estudios concluyen que aflibercept resulta beneficioso en pacientes con DMAE neovascular pudiendo conseguir similares resultados visuales que ranibizumab [Garcia-Layana et al. 2015; Rasmussen et al. 2016].

**Aflibercept como fármaco de primera intención:** En pacientes previamente no tratados o pacientes naive la práctica clínica real ha demostrado la eficacia de aflibercept, con mejoras visuales similares a las descritas en los estudios pivotaes. Como comentaremos posteriormente, aflibercept puede ser administrado según ficha técnica o siguiendo protocolos de tratamiento individualizados que, generalmente, se basan en cambios en la visión y / o en parámetros de actividad exudativa según la imagen de retinografía, OCT o AGF. Dentro de estos protocolos de tratamiento individualizados destacan, por su frecuente uso, la estrategia PRN en que la administración del fármaco se realiza tras objetivar recidiva de exudación y la estrategia *tratar y extender* (TE) en que se anticipa la inyección a la presencia de exudación y se alarga el periodo entre inyecciones y visitas.

Siguiendo el patrón descrito en ficha técnica, tres inyecciones en un intervalo mensual seguido de un tratamiento bimestral, Udaondo y colaboradores [Udaondo et al. 2016], describen que un 46.8% de los pacientes mejoraban  $\geq 15$  letras ETDRS, con descensos significativos en el grosor macular central (GMC) superiores a  $150 \mu$ . Mejores resultados obtienen Papavasileiou y colaboradores [Papavasileiou et al. 2015], que con un período de seguimiento de 14 meses, un 61.5% de los 26 ojos tratados mejoraban  $\geq 15$  letras ETDRS. Sin embargo, Khanani y colaboradores [Khanani 2015] ajustándose a ese mismo patrón de ficha técnica, en 16 pacientes, muestran una imagen «en dientes de sierra», con fluctuaciones en las mejoras visuales y anatómicas en los intervalos mensuales sin tratamiento, lo que justificarían, según a criterio de los autores, pautas

de tratamiento flexibles ajustadas a las necesidades y características de cada paciente en lugar del régimen fijo bimensual.

Dentro de las estrategias individualizadas el estudio de 101 pacientes tratados durante 1 año con aflibercept según un protocolo PRN, con una media de  $5.2 \pm 2.5$  inyecciones, consigue mejorías anatómicas y visuales con una reducción media del grosor foveal de  $104 \pm 139 \mu$  de y una ganancia visual pasando de  $0.44 \pm 0.33$  logMar a  $0.25 \pm 0.40$  logMar [Inoue et al. 2016]. Además, revela que un tratamiento crónico es necesario en la mayoría de los pacientes pues tras la dosis de carga el 67.7% va a volver a presentar criterios de exudación con una media de tiempo libre de enfermedad de 5 meses [Inoue et al. 2016]. Kim y colaboradores [Kim et al. 2016a], siguiendo el mismo esquema de tratamiento, con una media de inyecciones de  $4.3 \pm 0.9$  en 12 meses, consiguió también mejorías en la AV que pasó desde  $0.73 \pm 0.37$  logMar hasta  $0.58 \pm 0.41$  logMar.

Una serie de más de 1100 ojos, con un patrón de tratamiento TE y con un período de seguimiento mínimo de 24 meses, muestra mejoras visuales medias de 5 letras ETDRS, observando que en aquellos pacientes tratados con mayor número de inyecciones, la mejoría visual es mayor (2.7 letras ETDRS en aquellos con 9.7 inyecciones en dos años vs 7.8 letras ETDRS en pacientes tratados con 14.2 inyecciones y la proporción de pacientes con AV > 20/40 Snellen del 27% vs 45%) [Arnold et al. 2015]. La media de inyecciones, en los casos con mejorías anatómicas y funcionales superiores, es de 7.5 inyecciones el primer año y de 5.5 inyecciones el segundo año. Similares resultados obtuvieron Epstein y colaboradores [Epstein et al. 2016], quienes adoptando ficha técnica el primer año y una pauta TE durante el segundo, obtenían mejorías de 8 letras en la visión de lejos que se mantenían estables desde el mes 12 al mes 18. Objetivaron, además, que las mejorías en la visión lejana se acompañaban en paralelo con mejorías en la visión de cerca.

### **Aflibercept como terapia de rescate:**

Hay también mucha experiencia con el uso de aflibercept en pacientes que inicialmente fueron tratados con otros anti - VEGF. En general, las series publicadas muestran una buena respuesta tras el cambio o *switch* de fármaco. Aunque existen diferentes teorías del porqué de esta evolución favorable tras el cambio de fármaco, parece que es la taquifilaxia el mecanismo fisiopatológico más determinante [Lazzeri et al. 2015].

Nosotros [Cervera et al. 2014] fuimos de los primeros en publicar series de pacientes tratados con aflibercept como terapia de rescate, observando que, tras una única inyección de aflibercept

en pacientes que habían sido tratados con ranibizumab o bevacizumab, el 100% de nuestros pacientes (10 ojos) presentaban una respuesta anatómica favorable, con ausencia de fluido en un 80%, pero con una mejoría visual no estadísticamente significativa. Otros autores han publicado posteriormente series con mayor número de pacientes y períodos de seguimiento más largos, pero terminan por reflejar las conclusiones que nosotros habíamos extraído. Así, el grupo de Pinheiro - Costa [Pinheiro-Costa et al. 2015], en 85 ojos con un período de seguimiento de al menos un año, sí observaban en el 90.6% una mejoría anatómica significativa, con un descenso significativo del número de inyecciones mensuales (de 0.76 a 0.57,  $p < 0.001$ ) pero con un incremento no significativo de la AV. Barthelmes y colaboradores [Barthelmes et al. 2016], con un período de seguimiento de un año, no observan cambios a nivel de AV en los 384 ojos de estudio, pero describen un descenso en la proporción de membranas neovasculares que eran consideradas activas. Sin embargo, otros estudios aunque observan inicialmente una recuperación anatómica y funcional tras el cambio de fármaco, al año, aumenta el GMC (incremento hasta  $19.3 \pm 50.6 \mu$ ,  $p = 0.002$ ) y baja la AV ( $0.45 \pm 2.9$  líneas ETDRS,  $p = 0.06$ ) [He et al. 2015]. Un meta - análisis de diferentes estudios retrospectivos y prospectivos, concluye que en un período de seguimiento de 6 meses, el cambio a aflibercept se asocia a mejoras anatómicas y también funcionales [Seguin-Greenstein et al. 2016].

Tras realizar el cambio a aflibercept se han descrito también pautas de tratamiento diferentes a la ficha técnica. Una pauta PRN durante 24 meses tras el switch mantiene las mejorías anatómicas aunque sin mejorías visuales [Muftuoglu et al. 2016]. De forma análoga, Ricci y colaboradores [Ricci et al. 2016] observan que 1 año de aflibercept en protocolo fijo o PRN tras 3 inyecciones iniciales de ranibizumab consigue ganancias visuales y anatómicas.

La persistencia de un DEP fibrovascular o seroso en muchas ocasiones se considera un hallazgo morfológico de respuesta subóptima o de refractariedad al tratamiento previo administrado [Amoaku et al. 2015]. Los estudios pivotaes ya demostraron en pacientes naive un mayor aplanamiento del DEP con aflibercept que con ranibizumab, algo que también se ha encontrado en repetidas ocasiones en la práctica clínica habitual [Dirani et al. 2015; Hata et al. 2014; Udaondo et al. 2016]. En cuanto al comportamiento del DEP en pacientes refractarios, en períodos de seguimiento de un año se consiguen reducciones de la altura del mismo en cerca del 80% de los pacientes tratados [Broadhead et al. 2015; Major et al. 2015]. No obstante, dichos aplanamientos no se suelen correlacionar con cambios significativos en la AV [He et al. 2015].

Estos aplanamientos del DEP tanto en pacientes naive como en pacientes refractarios parecen deberse a la mayor capacidad de inhibición de VEGF - A y por el efecto sobre PIGF que presenta

aflibercept sobre ranibizumab [Amoaku et al. 2015]. No obstante, el hecho de que también existan series con el efecto contrario en pacientes refractarios no descarta que el fenómeno de taquifilaxia también pueda influir en esta respuesta anatómica. Un ejemplo de ello son los resultados publicados por Despreaux y colaboradores [Despreaux et al. 2016]. Este grupo describe los resultados al realizar el cambio desde aflibercept a ranibizumab en pacientes en que previamente habían hecho el *switch* de ranibizumab a aflibercept. Se obtiene en un total 47 ojos un beneficio a los 3 meses tras el intercambio a nivel anatómico (de  $317,8 \mu\pm 89,6$  a  $291,2 \mu\pm 76,6$ ) y visual (el 27 % ganaron  $\geq 5$  letras ETDRS).

### ***Seguridad clínica con aflibercept:***

El tratamiento con fármacos intravítreos antiVEGF (aflibercept, entre ellos) puede asociarse con efectos adversos tanto a nivel ocular, principalmente derivados de la técnica de la inyección intravítrea, como sistémicos que se piensan en relación con la inhibición del VEGF plasmático. No obstante, como hemos comentado anteriormente, la inhibición del VEGF plasmático producida por aflibercept es mínima [Frampton 2012] y los pacientes con DMAE pueden considerarse especialmente predisuestos a desarrollar acontecimientos tromboembólicos [Alexander et al. 2007] pues diversos factores de riesgo cardiovascular (tabaco, edad, nutrición...) constituyen también factores de riesgo para la DMAE [Lambert et al. 2016].

Para intentar elucidar si el tratamiento con aflibercept constituye o no un factor de riesgo cardiovascular añadido se han llevado a cabo diferentes estudios clínicos de seguridad. En el meta - análisis realizado por Kitchens y colaboradores [Kitchens et al. 2016] de los diferentes ensayos clínicos con aflibercept en distintas enfermedades, en donde analizan 10 estudios en fase II y III con más de 4000 pacientes incluidos, no se describen diferencias significativas en cuanto a efectos adversos entre los pacientes tratados con aflibercept y los grupos control. Además, hasta la fecha, en la práctica clínica se puede afirmar que el perfil de seguridad de aflibercept no difiere de otros antiangiogénicos [García-Layana et al. 2015].

### 1.5.3 Regímenes de tratamiento

Es evidente que los estudios pivotaes MARINA [Rosenfeld et al. 2006]y ANCHOR [Brown et al. 2006] supusieron un antes y un después en el tratamiento de los pacientes con DMAE exudativa. El tratamiento mensual con ranibizumab no solo conseguía estabilizar la AV, sino que, por primera vez, en un % de pacientes se conseguían mejoras visuales. En la actualidad está aceptado que el tratamiento fijo, que en el caso de aflibercept consistiría en inyecciones bimensuales tras una dosis de carga de tres inyecciones mensuales, es el que mejores ganancias de visión produce [Amoaku et al. 2015]. Sin embargo, el tratamiento mensual se ha mostrado una carga insostenible, en visitas e inyecciones, tanto para el paciente como para los diferentes sistemas sanitarios y en muchos casos podemos sobretratar o infratratar al paciente al no adaptar el tratamiento a su actividad exudativa [Khanani 2015].

Se han descrito, por tanto, diferentes protocolos que intentan proporcionar un tratamiento más individualizado. En líneas generales estos protocolos se dividen en (1) reactivos, en los que se trata una vez se objetivan signos de actividad exudativa morfológicos o funcionales; y en (2) proactivos, en los que se administra el tratamiento aun no viendo signos de exudación para intentar adelantarse a la enfermedad.

Dentro de las estrategias de tratamiento reactivas encontramos:

- **Pro re nata (PRN):** En este tipo de tratamiento, tras la dosis de carga se realiza una monitorización mensual del paciente en base a criterios funcionales (pérdida de visión) y/o anatómicos (signos de exudación en imágenes de OCT, retinografía o angiografía) [Amoaku et al. 2015].
- **Esperar y extender:** En este tipo de tratamiento después de una dosis de carga inicial se realiza un protocolo flexible basado en una estrategia PRN en que sólo se administra la inyección si existe actividad de la enfermedad. A diferencia del PRN, que requiere la monitorización mensual del paciente, en este protocolo, en caso de ausencia de actividad exudativa el tiempo entre las visitas de seguimiento se va alargando progresivamente hasta un máximo de 8 semanas [Arias et al. 2011]. En caso de encontrar actividad exudativa se reiniciaría un tratamiento mensual. Este protocolo presenta la ventaja de realizar un menor número de visitas que un PRN convencional por lo que mejoraría la carga asistencial. Sin embargo, es más frecuente el infratratamiento [Arias et al. 2011].

- **Fusion:** Es un tipo de tratamiento que únicamente se ha probado con ranibizumab. Consiste en una combinación de inyecciones mensuales fijas con una pauta PRN [Mones et al. 2012].
- **PRN capado:** Modificación del tratamiento PRN en que la monitorización se realiza de forma mensual y aún sin signos de actividad se administra una inyección cada 4 meses [Lala et al. 2013].

Dentro de las estrategias de tratamiento proactivas encontramos:

- **Tratar y extender (TE):** Los pacientes son tratados con inyecciones mensuales hasta que no se objetivan signos de exudación (funcionales y anatómicos). En ese momento los intervalos de las visitas son alargados 2 semanas hasta un máximo de 12 semanas (o hasta 2 semanas menos que la última extensión [Berg et al. 2015]), recibiendo el paciente una inyección cada vez que es visitado aunque no tenga signos de exudación activa. Si en alguna de las visitas se objetiva reactivación del componente vascular, el paciente es de nuevo tratado mensualmente hasta la consecución de un nuevo periodo de inactividad [Toalster et al. 2013]. Este tipo de tratamiento surge con la idea de minimizar el número de recurrencias siendo necesarias menos inyecciones y menos visitas que en los regímenes fijos. También se reduce el sobretreatmento [Freund et al. 2013].
- **Observar y planificar:** Aunque inicialmente constituye una estrategia reactiva su objetivo es anticiparse a la enfermedad. Se basa en tras una dosis de carga de 3 inyecciones, realizar un seguimiento mensual para averiguar el tiempo de reactivación de cada paciente. Una vez conseguido, se programan inyecciones 2 semanas antes del tiempo de reactivación para cada paciente [Mantel et al. 2014].

## Capítulo 2

# Hipótesis y objetivos

### 2.1 Hipótesis

La DMAE constituye la primera causa de ceguera en los países industrializados y dada su relación con el proceso de envejecimiento en los próximos años se prevee un gran aumento de su incidencia. Los fármacos anti - VEGF, entre los que se incluye el aflibercept, son en la actualidad el tratamiento *gold - standard* para tratar esta patología. Con el objetivo de reducir la sobrecarga asistencial - en visitas y tratamiento - que supone el tratamiento mensual, se han diseñado diferentes estrategias de tratamientos, entre las que se incluye la pauta TE. Por otro lado, el creciente desarrollo de las técnicas de imagen ha permitido el descubrimiento de hallazgos anatómicos útiles como elementos diagnósticos y de monitorización. Nuestro trabajo consistirá en la evaluación de la eficacia de un año de tratamiento en pauta TE con aflibercept en pacientes con DMAE exudativa naïve, analizando si existen cambios en los parámetros morfológicos retinianos, en la ganancia visual y en el número de inyecciones o visitas requeridas en función de una subclasificación multimodal de los complejos neovasculares. De forma paralela, en los últimos años, se está adquiriendo solidez científica sobre la implicación de los exosomas (microvesículas extracelulares con importantes funciones de comunicación celular) en la patogenia de la DMAE. Realizaremos, así mismo, un estudio piloto en el que se cuantificará el número de exosomas plasmáticos circulantes CD9RPE65 en dos poblaciones de pacientes: en pacientes sanos y en pacientes con DMAE exudativa.

## 2.2 Objetivos

1. Valorar la eficacia de un protocolo de tratamiento de TE en pacientes con DMAE y realizar un subanálisis del número de inyecciones y / o visitas requeridas según el subtipo de complejo neovascular.
2. Estudiar los cambios en la ultraestructura externa de la retina y de los parámetros exudativos a lo largo del tratamiento en los distintos subtipos neovasculares.
3. Identificar factores pronósticos anatómicos y funcionales en los subtipos neovasculares.
4. Analizar la existencia de cambios en el grosor coroidal con el tratamiento con aflibercept.
5. Realizar un aislamiento y una cuantificación de exosomas circulantes CD9RPE65 en pacientes sin enfermedad retiniana y en pacientes con DMAE exudativa de reciente diagnóstico y comparar los resultados obtenidos.

## Capítulo 3

# Material y métodos

### 3.1 Estudio clínico

#### 3.1.1 Diseño del estudio

Estudio restrospectivo, no aleatorizado de pacientes que acudieron a la unidad de mácula del Hospital General y Universitario de Valencia entre el 01/10/2014 y el 01/05/2015 por NVC - naive secundaria a un proceso DMAE exudativa tratados mediante aflibercept (Eylea, Bayer, Hispania S.L; España) 2 mg/ 0,05 ml de acuerdo a un proctolo de tratamiento consistente en una dosis de carga de 3 inyecciones mensuales seguidas de un protocolo de tratamiento de tipo TE y un período mínimo de seguimiento de 1 año.

#### 3.1.2 Materiales y recursos utilizados

El estudio clínico ha sido íntegramente realizado en las consultas externas de oftalmología del *Hospital General y Universitario de Valencia* (HGUV). Para su realización se han utilizado las estancias, personal, aparatos y materiales de los que disponemos en el área de consultas externas, quirófano y farmacia del HGUV.

- **Entorno y estancias:**

- Consultas equipadas para la exploración del paciente del HGUV.
- Quirófanos de oftalmología del HGUV.

- Farmacia hospitalaria del HGUV.

- **Recursos humanos:**

- Médicos oftalmólogos especializados en retina del HGUV.
- Enfermeras y auxiliares de enfermería de consulta y de quirófano de oftalmología del HGUV.
- Farmacéuticos.

- **Equipos e instrumental:**

- Equipos para el examen oftalmológico:
  - \* Optotipos ETDRS, con tubos fluorescentes adecuados a las normativas para la toma de AV en ensayos clínicos.
  - \* Lámpara de hendidura para la exploración oftalmológica.
  - \* Lente de aumento de 78 dioptrías ( Volk, Mentor, Ohio, EEUU) para la exploración de fondo de ojo.
  - \* Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD - OCT) (3D OCT - 2000 SD - OCT, Topcon Medical Systems, Inc., Oakland, EEUU).
  - \* Retinógrafo, equipo de autofluorescencia y angiógrafo digital (50<sup>o</sup> TopCon TRC - 50IX Retinal Camera, Topcon Medical Systems, Inc., Oakland, EEUU).
- Equipos, material fungible e instrumental de cirugía:
  - \* Cabina quirúrgica para inyecciones intravítreas modelo (ArcEsterile; Imex, España).
  - \* Blefarostato.
  - \* Campos estériles.
  - \* Gasas estériles.
  - \* Hemostetas (micro esponjas quirúrgicas Alcon Cusi S.A; El Masnou, España).
  - \* Jeringas de plástico 1 ml.
  - \* Agujas desechables de 30G.

- **Reactivos y fármacos:**

– Examen oftalmológico

\* Colirio de fenilefrina al 1 % (Colircusi fenilefrina, colirio en solución 100 mg/ml, Alcon Cusi S.A; El Masnou, España).

\* 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).

\* Colirio oftálmico de cloranfenicol y dexametasona (Oftalmolosa Cusi Deicol, Alcon Cusi S.A; El Masnou, España).

\* Afibercept 2 mg (Eylea 40 mg/ml solución inyectable en vial, Bayer Hispania S.L; España).

### 3.1.3 Muestra y selección de pacientes

El estudio se realizó sobre pacientes que acudieron a consultas externas de oftalmología del HGUV por DMAE neovascular de diagnóstico en el período comprendido entre el 01/10/2014 y 01/05/2015 ambos inclusive. Dado que el estudio es de características retrospectivas, la elección del medicamento empleado para su tratamiento y el protocolo de administración del mismo no se vio modificado por la realización del estudio. En el momento de la recogida de los datos los pacientes fueron conocedores de la realización del estudio. Tras recibir información completa y detallada, todos los pacientes firmaron su consentimiento informado para la participación en el mismo en base a lo estipulado en la normativa vigente ( Ley 41/2002 del 14 de noviembre: *Ley Básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica: BOE núm.274, de 15 - 11 - 2002, pp 40126 - 40132*). El estudio fue llevado a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki, promulgada por la Asociación Médica Mundial (WMA) en su última revisión de 2008; y fue aprobado por el Comité Ético para la investigación clínica del HGUV (Apéndice A).

Los criterios de inclusión de los pacientes fueron:

- Edad superior a 18 años.

- Presencia de DMAE exudativa tratada desde su diagnóstico únicamente con aflibercept debido a una decisión motivada por la práctica clínica habitual.
- Haber finalizado 1 año de tratamiento de acuerdo a un protocolo de tipo TE con aflibercept.
- Mejor agudeza visual corregida (MAVC) mínima inicial en el momento del diagnóstico de 0,05 decimal en el ojo objeto de estudio.
- Aquellos que consientan y acepten al análisis retrospectivo de sus datos.

Se consideraron criterios de exclusión:

- El incumplimiento de alguno de los criterios de inclusión.
- No consentimiento inicial de realización del análisis retrospectivo.
- Existencia de exudación macular secundaria a VCP.
- Existencia de otra patología retiniana que imposibilite la diferenciación de los resultados anatómicos y funcionales secundarios propiamente a la DMAE (patología de la interfase vitreorretiniana. . .).
- Existencia de patología sistémica u ocular que imposibilite la recogida o análisis de datos (leucoma corneal, cataratas. . .).

#### 3.1.4 Protocolo de exploración y parámetros de estudio

Se recogieron los datos de la exploración de los pacientes que tuvo lugar: (1) En la visita basal en el momento del diagnóstico de la DMAE exudativa, (2) a los 3 meses del diagnóstico, tras haber recibido las 3 inyecciones de la dosis de carga, (3) a los 6 meses del diagnóstico, (4) a los 12 meses del diagnóstico.

En cada una de las visitas se incluyeron las siguientes pruebas diagnósticas:

- **En la visita basal:**
  - Anamnesis personal (a modo de revisión de la historia clínica electrónica del HGUV) incluyendo características clínicas, demográficas y comorbilidades de los pacientes; tales como:

- 
- \* Edad y sexo.
  - \* Ojo de estudio.
  - \* Antecedente de DMAE exudativa en el ojo contralateral.
  - \* Antecedente de Glaucoma en el ojo de estudio.
  - \* Diabetes mellitus.
  - \* Hipertensión arterial.
  - \* Hipercolesterolemia.
  - \* Cardiopatía.
  - \* Antecedente de accidente cerebrovascular isquémico y / o hemorrágico.
  - \* Toma concomitante de medicación antiagregante / anticoagulante.
- Toma de MAVC mediante optotipos ETDRS.
  - Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 78 dioptrías de fondo de ojo.
  - Realización mediante SD - OCT de un cubo (B - scan) de 9 x 9 mm del área macular.
  - Realización de retinografía.
  - Realización de AF.
  - Realización de AGF ( $\pm$  IVA en caso de sospecha de VCP).
- **En la visita a los 3 meses**
    - Toma de MAVC mediante optotipos ETDRS.
    - Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 78 dioptrías de fondo de ojo.
    - Realización mediante SD-OCT de un cubo (B-scan) de 9 x 9 mm del área macular.
- **En la visita a los 6 meses**
    - Toma de MAVC mediante optotipos ETDRS.
    - Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 78 dioptrías de fondo de ojo.
    - Realización mediante SD - OCT de un cubo (B - scan) de 9 x 9 mm del área macular.

- **En la visita a los 12 meses**

- Toma de MAVC mediante optotipos ETDRS.
- Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 78 dioptrías de fondo de ojo.
- Realización mediante SD - OCT de un cubo (B - scan) de 9 x 9 mm del área macular.
- Realización de retinografía.
- Realización de AF.

Así mismo, se recogieron los datos del número de inyecciones intravítreas administradas y del número de visitas realizadas en los 12 meses de seguimiento.

Los parámetros de estudio y la medida de los mismos se realizó de a la siguiente manera:

1. **Toma de agudeza visual** La toma de MAVC se realizó mediante el uso de optotipos - ETDRS en condiciones lumínicas adecuadas, a una distancia adaptada para cada optotipo (entre 4 - 6 metros) y con la refracción óptica corregida.

2. **Presencia / ausencia de hallazgos fundoscópicos sugestivos de DMAE exudativa** En condiciones de midriasis pupilar, se realizó el examen de fondo de ojo con una lente de aumento de 78 dioptrías, la retinografía color y el examen con autofluorescencia. Los parámetros analizados fueron:

- Drusas y subtipo de las mismas ( duras, blandas, pseudodrusas reticulares).
- Hemorragias retinianas.
- Exudados lipídicos.
- Atrofia geográfica.
- Cicatriz disciforme.

3. **Clasificación del complejo neovascular y localización del mismo:** una vez analizadas las imágenes de retinografía, SD - OCT y AGF se procedió a la clasificación multimodal del complejo neovascular. Para ello, se empleó la clasificación descrita en 2010 por Freund y colaboradores [Freund et al. 2010] en base a los hallazgos histopatológicos de Gass [Gass 1994]. Se dividieron los complejos neovasculares en:

- NVC tipo 1: Cuando el proceso neovascular se encontraba por debajo del EPR.
- NVC tipo 2: Cuando la membrana había penetrado el EPR y se encontraba por encima del mismo, en el espacio subretiniano.
- NVC tipo mixta: Cuando el tejido neovascular se encontraba por encima y por debajo del EPR, combinando tanto NVC tipo 1 como tipo 2.
- NVC tipo 3 o RAP: Cuando la neovascularización se iniciaba a nivel intrarretiniano. Este tipo de NVC se subdividió en estadios conforme a lo descrito por Yannuzzi [Yannuzzi et al. 2001].
  - Estadio I: Proliferación capilar intrarretiniana.
  - Estadio IIa: Extensión de la proliferación intrarretiniana más allá de los fotorreceptores hasta el espacio subretiniano.
  - Estadio IIb: Proliferación intrarretiniana y subretiniana que asocia DEP.
  - Estadio III: Anastomosis entre la proliferación intrarretiniana con una NVC coroidea y DEP vascularizado.

En base a la localización del complejo neovascular distinguimos.

- Extrafoveal: A más de 200  $\mu$  de la ZAF.
  - Yuxtafoveal: A menos de 200  $\mu$  de la ZAF.
  - Subfoveal: Por debajo de la fovea.
4. **Grosor macular central (GMC) y volumen macular (VM):** Para su medida se empleó el software automatizado del equipo de SD - OCT (3D OCT - 2000 SD - OCT, Topcon Medical Systems, Inc., Oakland, EEUU).
5. **Parámetros de exudación activa:** Tales como:
- Líquido intrarretiniano (LIR)
  - Líquido subretiniano (LSR)
  - Desprendimiento del epitelio pigmentario (DEP): En caso de estar presente se clasificó en (1) DEP fibrovascularizado o (2) DEP serovascularizado. Así mismo, se midió la altura del mismo (distancia máxima entre la parte externa del EPR y la parte más

interna de la membrana de Bruch) a nivel subfoveal, a 500  $\mu$  nasales a la fóvea, a 500  $\mu$  temporales a la fóvea y en la zona de máxima altura del DEP.

6. **Grosor coroideo:** Se realizó la medida manual del grosor coroideo (distancia entre la porción interna de la membrana de Bruch y la interfaz corioescleral) a nivel subfoveal, a 500  $\mu$  nasales a la fóvea, a 500  $\mu$  temporales a la fóvea.
7. **Integridad de la MLE y de ZE:** La medida de la integridad de estas líneas se realizó en base al método descrito por Oishi y colaboradores en 2013 [Oishi et al. 2013], mediante el cual medían las zonas de integridad de dichas capas de la retina externa en las 1000  $\mu$  nasales y temporales a la fóvea.

### 3.1.5 Administración de medicación intravítrea

- **Procedimientos e intervenciones:** Los pacientes recibieron tratamiento intravítreo de 2 mg - aflibercept de acuerdo a un protocolo de tratamiento de tipo TE. Dicho protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera: tras una fase de dosis de carga consistente en 3 inyecciones mensuales, los pacientes eran tratados en todas las visitas y evaluados conforme a la presencia de actividad exudativa. Si se descartaba la exudación activa el intervalo de las visitas era alargado 2 semanas, hasta un máximo de 12 semanas. Por el contrario, si algún tipo de actividad exudativa estaba presente el intervalo se acortaba al mínimo tiempo aceptado entre visitas que consistía en 4 semanas. Se consideraba actividad exudativa:
  - Un descenso en MAVC  $\geq 5$  letras ETDRS no justificable por otras razones oftalmológicas
  - La presencia/aparición de líquido subretiniano (LSR) o líquido intrarretiniano (LIR).
  - Un aumento del GMC  $\geq 100 \mu$ .
  - La aparición de nuevas hemorragias retinianas o fuga activa en la AGF.
- **Técnica de inyección:** La inyección intravítrea se realiza en el entorno limpio del quirófano mediante la disposición de un arco estéril con medidas de asepsia siguiendo el siguiente protocolo:
  - \* Instilación de colirio anestésico (Colircusi anestésico doble, Alcon Cusi; El Masnou, España) en el ojo a pinchar.

- \* Desinfección ocular con povidona yodada diluída al 5% con suero fisiológico y desinfección periocular con povidona yodada diluída al 10%.
- \* El médico, provisto de mascarilla, bata y guantes estériles coloca el paño perforado y el blefarostato estériles.
- \* Marcación de punto de inyección con compás estéril a 3,5 mm del limbo en pacientes pseudofáquico y a 4 mm del limbo en pacientes fáquicos.
- \* Inyección de la medicación con aguja de 30G dirigiéndola hacia el centro de la cavidad vítrea.
- \* Masaje sobre punto de incisión con hemosteta estéril, una vez sacada la aguja.
- \* Desinfección ocular con povidona yodada diluída al 5%.
- \* Instilación de colirio de cloranfenicol y dexametasona ( Colircusi DeIcol, Alcon Cusi; El Masnou, España).
- \* Comprobación de visión y de latido de la arteria central de la retina mediante oftalmoscopia.

### **3.1.6 Recogida de datos**

Los datos de los pacientes quedan recogidos en la historia clínica electrónica del HGUV. Para poder llevar a cabo el análisis conjunto de los datos y facilitar los análisis estadísticos, los datos de cada paciente fueron pasados a una tabla excel. En dicha tabla los pacientes se identificaron en base a una numeración correlativa precedida por el código VC - 0, no apareciendo datos de correlación con la historia clínica electrónica y siendo el investigador principal el único con capacidad de correlacionar al paciente con dicho código e imposibilitando de esta manera su identificación por terceras personas.

### **3.1.7 Análisis estadísticos**

#### ***Análisis descriptivo:***

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

**Análisis estadístico inferencial:**

**Hipótesis nula y alternativa:** En nuestro caso la hipótesis nula establecía que no se producían cambios en ninguna de las variables estudiadas antes y después del tratamiento (inyección intravítrea de 2 mg de aflibercept en protocolo TE). La hipótesis alternativa sugiere, por el contrario, que sí se producen cambios en las medias de las variables medidas ya sea en su análisis con respecto a los datos a los 3, 6 o 12 meses. Por ejemplo, si el nivel de MAVC en alguno de los análisis (3 meses, 6 meses o 12 meses) era superior o inferior al basal con un nivel de diferencia estadísticamente significativa que nos llevara a aceptar la hipótesis alternativa, interpretamos que aparece alteración: aceptamos la hipótesis alternativa de que el tratamiento intravítreo TE con aflibercept 2 mg produce cambios en la AV.

**Nivel de significatividad estadística: El valor de  $p$ :**

En los análisis de estadística inferencial, el valor  $p$  (conocido como  $p$  - *value*) se define como la probabilidad de obtener un resultado como el que se ha obtenido suponiendo que la hipótesis nula es cierta. En todos los análisis hemos empleado un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0.05$ ); es decir, que establecemos que si la probabilidad de que un determinado resultado se deba al azar es  $< 5\%$  vamos a aceptar que no se ha debido al azar y aceptaríamos la hipótesis alternativa. No obstante, tenemos que tener en cuenta que podríamos estar ante una observación atípica y que estaríamos incurriendo en un error al rechazar la hipótesis nula cuando es cierta.

- $p \geq 0.05$ : Existe demasiada probabilidad de que la diferencia se deba al azar, por lo que no existe suficiente evidencia para aceptar que las diferencias son estadísticamente significativas. No podemos rechazar la hipótesis nula.
- $p < 0.05$ : Se acepta que las diferencias probablemente no se deban al azar, y se dice que el resultado es estadísticamente significativo. Se acepta la hipótesis alternativa.

**Pruebas estadísticas realizadas:**

Previa a la realización de las distintas pruebas estadísticas se comprobó la distribución normal de las distintas variables mediante el test de normalidad de Kolmogoroff - Smirnov. Aplicamos pruebas paramétricas cuando las muestras superaban dicha comprobación de normalidad, y pruebas no paramétricas cuando las variables analizadas no cumplían criterios de una distribución normal.

- **Test de Wilcoxon de muestras relacionadas no paramétricas:** Es una prueba que compara medias de dos variables continuas apareadas no paramétricas. Por ejemplo, para contrastar los cambios en el GMC entre los distintos análisis realizados en el tiempo.
- **Test de Fischer:** Se ha empleado este test para la comparación de medias de dos variables discretas apareadas. Por ejemplo para analizar si se producen cambios con respecto a la presencia de hemorragias o de fibrosis.
- **Prueba de Kruskal - Wallis:** Este test se ha utilizado para la comparación de medias entre variables medidas apareadas no paramétricas medidas en varias de ocasiones. Permite superar las limitaciones de hacer contrastes bilaterales por parejas que son un mal método para determinar si un conjunto de variables con  $n > 2$  difieren entre sí y, a diferencia del análisis de la varianza o test de ANOVA no supone la normalidad de los datos. Por ejemplo, se ha utilizado este test para ver si se producían cambios en cada una de las variables continuas en cada tipo de complejo neovascular a lo largo del tiempo.
- **Coefficiente de correlación de Spearman:** Este coeficiente es un índice independiente de la escala de medida de las variables, que mide la relación entre dos variables aleatorias cuantitativas no paramétricas. Es decir, mide el grado de relación de dos variables siempre y cuando ambas sean cuantitativas. El valor del índice de correlación varía en el intervalo  $[-1, 1]$ , por lo que podemos obtener diferentes resultados:
  - Si  $r = 1$ , existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante.
  - Si  $0 < r < 1$ , existe una correlación positiva. Es una correlación lineal directamente proporcional
  - Si  $r = 0$ , no existe relación lineal. Pero esto no necesariamente implica que no haya otro tipo de relaciones entre las variables: pueden existir todavía relaciones no lineales entre las dos variables.
  - Si  $-1 < r < 0$ , existe una correlación negativa. Es una correlación lineal inversamente proporcional

- Si  $r = -1$ , existe una correlación negativa perfecta. El índice indica una tendencia total entre las dos variables llamada relación inversa: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en proporción constante.

Para establecer la fuerza de la relación, generalmente se establece como punto de corte 0.7.

- Si  $r$  entre 0 y 0.7: Relación directamente proporcional débil.
- Si  $r$  entre 0.7 y 1: Relación directamente proporcional fuerte.
- Si  $r$  entre 0 y -0.7: Relación inversamente proporcional débil.
- Si  $r$  entre -0.7 y -1: Relación inversamente proporcional fuerte.

## 3.2 Estudio experimental

### 3.2.1 Diseño del estudio

Estudio prospectivo, no aleatorizado en que se realiza la medida de exosomas plasmáticos en dos cohortes de pacientes:

- **Pacientes caso:** Pacientes que hayan sido diagnosticados de neovascularización coroidea (NVC) - naive secundaria a un proceso DMAE exudativa subsidiarios del tratamiento con antiVEGF, previo al inicio del tratamiento con dichos fármacos conforme a la práctica clínica habitual.
- **Pacientes controles:** Pacientes pendientes de ser intervenidos de cirugía de catarata, que en la exploración oftalmológica prequirúrgica se objetiva ausencia de patología retiniana.

### 3.2.2 Materiales

### 3.2.3 Materiales y recursos utilizados

- **Entorno y estancias:**
  - Consultas equipadas para la exploración del paciente en el HGUV.
  - Quirófanos de oftalmología del HGUV.

- Farmacia hospitalaria del HGUV.
  - Fundación de Investigación del HGUV y banco de muestras.
  - Laboratorio de fisiología de la UCV, sede San Carlos Borromeo.
  - Unidad de investigación experimental, del Hospital General y Universitario de Albacete.
- **Recursos humanos:**
    - Médicos oftalmólogos especializados en retina del HGUV.
    - Enfermeras y auxiliares de enfermería de consulta y de quirófano de oftalmología del HGUV.
    - Enfermeras de la Fundación de Investigación del HGUV.
    - Farmacéuticos
    - Biólogos y personal de laboratorio de la UCV.
    - Biólogos y personal de laboratorio del Hospital General y Universitario de Albacete.
- **Equipos e instrumental:**
    - Equipos para el examen oftalmológico:
      - \* Optotipos ETDRS, con tubos fluorescentes adecuados a las normativas para la toma de AV en ensayos clínicos.
      - \* Lámpara de hendidura para la exploración oftalmológica.
      - \* Lente de aumento de 78 dioptrías ( Volk, Mentor, Ohio, EEUU) para la exploración de fondo de ojo.
      - \* Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD - OCT) (3D OCT - 2000 SD - OCT, Topcon Medical Systems, Inc., Oakland, EEUU).
      - \* Retinógrafo, equipo de AF y angiógrafo digital (50<sup>o</sup> TopCon TRC - 50IX Retinal Camera, Topcon Medical Systems, Inc., Oakland, EEUU).
    - Equipos, material fungible e instrumental de cirugía y toma muestral:
      - \* Aguja de extracción sanguínea.

- \* Tubos de 9 ml de citrato sódico al 3,2 %.
- Equipos, material fungible e instrumental de laboratorio:
  - \* Tubos para la centrifugadora.
  - \* Tubos Eppendorf.
  - \* Váscula.
  - \* Ultracentrifugadora.
  - \* Citómetro de flujo FACScan (FACScan; Beckman Coulter).
- **Reactivos y fármacos:**
  - Examen oftalmológico
    - \* Colirio de fenilefrina al 1 % (Colircusi fenilefrina, colirio en solución 100 mg/ml, Alcon Cusi S.A; El Masnou, España).
    - \* Colirio de tropicamida al 1 % (Colircusi tropicamida, colirio en solución 10 mg/ml, Alcon Cusi S.A; El Masnou, España).
  - Aislamiento de exosomas
    - \* Agua destilada (S. Marí S.L., Ribarroja del Turia; Valencia, España).
    - \* TBS filtrado x 1.
  - Citometría de flujo
    - \* Anticuerpos anti - CD9 (Abcam, BD).
    - \* Anticuerpos anti - RPE65 (Abcam, BD).

### 3.2.4 Selección de pacientes

La cohorte de pacientes enfermos o casos se llevó a cabo mediante el reclutamiento de pacientes recientemente diagnosticados de neovascularización coroidea secundaria a DMAE exudativa en el HGUV subsidiarios de tratamiento por motivos clínicos previo al inicio del tratamiento intravítreo. La cohorte de pacientes sanos o controles se formó en base a pacientes programados para cirugía de catarata en el HGUV con ausencia de patología retiniana concomitante. El estudio fue llevado a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki, promulgada por la Asociación Médica Mundial (WMA) en su última revisión de 2008; y fue aprobado por

el Comité Ético para la investigación clínica del HGUV (Apéndice B). En el momento de la recogida de los datos los pacientes fueron conocedores de la realización del estudio. Tras recibir información completa y detallada, todos los pacientes firmaron su consentimiento informado para la participación en el mismo en base a lo estipulado en la normativa vigente (Ley 41/2002 del 14 de noviembre).

Los criterios de inclusión de los pacientes fueron:

- Edad entre 65 y 90 años.
- Presencia de DMAE exudativa tratada de reciente diagnóstico subsidiaria de tratamiento previo al inicio del tratamiento intravítreo.
- Mejor agudeza visual corregida (MAVC) mínima inicial de 0,05 decimal en el ojo objeto de estudio en su momento de su inclusión en el mismo.
- Aquellos que consientan y acepten al análisis retrospectivo de sus datos.

Se consideraron criterios de exclusión:

- El incumplimiento de alguno de los criterios de inclusión.
- No consentimiento inicial de realización del análisis retrospectivo.
- Existencia de exudación macular secundaria a VCP.
- Existencia de otra patología retiniana que imposibilite la diferenciación de los resultados anatómicos y funcionales secundarios propiamente a la DMAE (patología de la interfase vitreoretiniana...).
- Existencia de otra patología retiniana que imposibilite la diferenciación de los exosomas del EPR en probable relación con el daño oxidativo que acontece en la DMAE de otros exosomas del mismo origen pero con diferente etiología, como en el caso de las distrofias retinianas.
- En el caso de pacientes controles, existencia de cualquier tipo de patología retiniana subsidiaria de producir un aumento de exosomas plasmáticos de forma uni o bilateral.
- Existencia de patología sistémica u ocular que imposibilite la recogida o análisis de datos.

- Existencia de patología neoplásica ocular o sistémica concomitante con o sin tratamiento en el momento de la recogida muestral.

### 3.2.5 Protocolo de exploración y parámetros de estudio

Los pacientes se seleccionaron en base a los parámetros anteriormente descritos (Ver "Selección de pacientes") En el caso de los pacientes caso se recogieron los datos de la exploración en que se diagnóstico el proceso neovascular, previo al inicio del tratamiento. En el caso de los pacientes controles, se recogieron los datos de la exploración oftalmológica realizada conforme a la práctica clínica habitual previa a la indicación y programación de la cirugía de catarata. Los datos de los exosomas se analizaron tras una extracción muestral de plasma realizada: (1) previa a la inyección del tratamiento intravítreo en los pacientes caso y (2) previa a la intervención de cirugía de cataratas en los pacientes controles.

- **Datos en el momento del diagnóstico de DMAE exudativa**
  - Anamnesis personal, para confirmar la presencia de criterios de inclusión y ausencia de criterios de exclusión.
  - Edad y sexo.
  - Toma de MAVC mediante optotipos ETDRS.
  - Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 78 dioptrías de fondo de ojo.
  - Realización mediante SD - OCT de un cubo ( B - scan) de 9 x 9 mm del área macular.
  - Realización de retinografía.
- **Datos en la visita oftalmológica previa a la programación de cirugía de cataratas.**
  - Anamnesis personal, para confirmar la presencia de criterios de inclusión y ausencia de criterios de exclusión.
  - Edad y sexo.
  - Toma de MAVC mediante optotipos ETDRS.

- Exploración con lámpara de hendidura y lente de aumento de 78 dioptrías de fondo de ojo.
- Realización mediante SD - OCT de un cubo ( B - scan) de 9 x 9 mm del área macular.
- Realización de retinografía.

### 3.2.6 Obtención y tratamiento de las muestras

#### *Obtención de las muestras*

La extracción muestral se llevará a cabo en el HGUV:

- Extracción de un volumen de sangre por paciente (9 - 18 ml) en tubos de citrato sódico al 3,2% bajo condiciones de esterilidad, mediante el procedimiento de flebotomía convencional para la extracción de muestra de sangre periférica.
- Almacenaje de la misma en nevera a 4° en posición horizontal garantizando un transporte en un periodo máximo de 3 horas hasta el laboratorio principal de análisis muestral localizado en la facultad de Medicina de la UCV según condiciones necesarias para el transporte de muestras biológicas humanas.

#### *Aislamiento de exosomas*

Dicho procedimiento se realizó en el laboratorio de fisiología de la Facultad de Medicina de la UCV conforme al siguiente protocolo (Figura 3.1):

- Centrifugación de la muestra a 160xg durante 20 minutos con el fin de separar el componente plasmático. Reclutamiento del plasma y traspaso del mismo a un tubo nuevo, anotando el volumen de plasma obtenido.
- Centrifugación a 700xg durante 30 minutos a 15° con el objetivo principal de eliminar el debris celular. Desechamiento del pellet y trasvaso del sobrenadante a un tubo de ultracentrífuga.
- Centrifugación a 14.000xg durante 30 minutos para eliminar los cuerpos apoptóticos que están todavía presentes en el sobrenadante. Desechamiento del pellet.

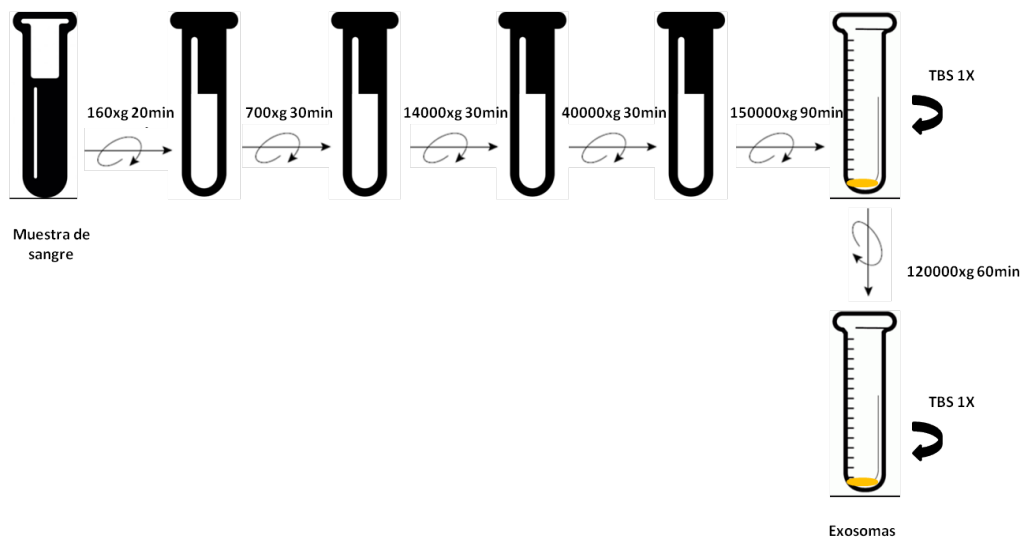


Figura 3.1: Aislamiento de exosomas.

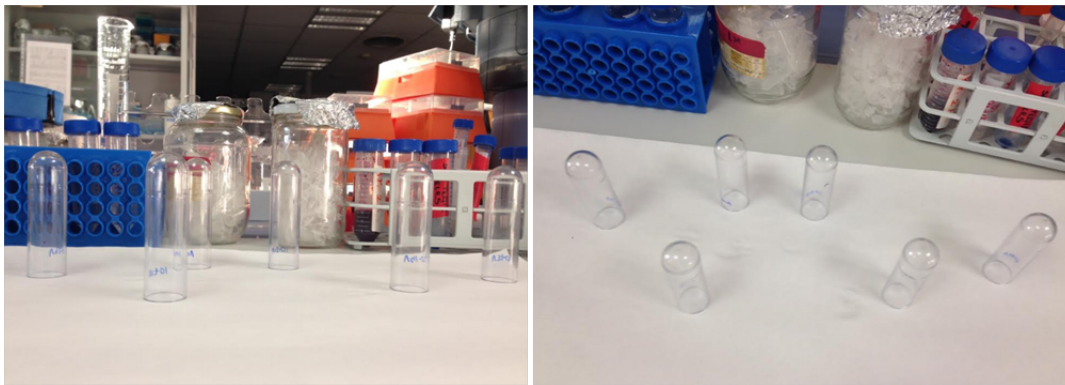


Figura 3.2: Desechamiento del sobrenadante con pellet de exosomas.

- Centrifugación del sobrenadante a 40.000xg durante 30 minutos y trasvase del sobrenadante a un tubo de ultracentrífuga.
- Centrifugación a 150.000xg durante 90 minutos con el objetivo de obtener en el fondo del tubo ya los exosomas.
- Desechamiento final del sobrenadante y resuspensión en 8 ml de TBS 1X.
- Centrifugación a 120.000xg durante 60 minutos para limpiar los restos de medio que hayan podido quedar. Desechamiento del sobrenadante (Figura 3.2) y resuspensión del pellet en TBS 1X a concentración 100X.
- Almacenaje de la muestra en nevera a 4° durante 24 h y trasvase a un tubo Eppendorf para su posterior uso.

### *Citometría de flujo*

La cuantificación exosómica mediante un procedimiento de citometría de flujo se realizó en el laboratorio del Hospital General y Universitario de Albacete según lo siguiente:

- Marcaje de los exosomas mediante anticuerpos anti-CD9 (Abcam, BD) según el procedimiento descrito por Hong y colaboradores [Hong et al. 2014] y estudio de los mismos mediante un citómetro de flujo FACScan (FACScan; Beckman Coulter), recogándose 10000 eventos para cada muestra.
- De la misma manera, los exosomas se marcan con anticuerpos anti-RPE65 CD9 (Abcam, BD) y se realiza si posterior estudio.
- Análisis de los resultados con el software de BD  $\ll FACSuite \gg$ .

#### **3.2.7 Recogida de datos**

De forma similar al estudio clínico, para poder llevar a cabo el análisis conjunto de los datos y facilitar los análisis estadísticos, los datos de cada paciente fueron pasados a una tabla excel. En dicha tabla los pacientes se identificaron en base a una numeración correlativa precedida por el código  $\ll C- \gg$  en el caso de los controles y  $\ll N- \gg$  en el caso de los pacientes con DMAE.

#### **3.2.8 Análisis estadísticos**

Previa a la realización de las distintas pruebas estadísticas se comprobó la distribución normal de las distintas variables mediante el test de normalidad de Kolmogoroff - Smirnov. Aplicamos pruebas paramétricas pues los datos a valorar seguían criterios de normalidad.

- **Test de T de Student de muestras relacionadas paramétricas:** Es una prueba que compara medias de dos variables continuas apareadas que siguen criterios de normalidad.



## Capítulo 4

# Resultados

### 4.1 Resultados: Estudio clínico

A continuación exponemos los resultados obtenidos en la realización de un estudio retrospectivo, no aleatorizado de pacientes que acudieron a la unidad de mácula del HGUV entre el 01/10/2014 y el 01/05/2015 por NVC - naive secundaria a un proceso DMAE exudativa tratados mediante aflibercept (Eylea, Bayer, Hispania S.L; España) 2 mg / 0,05 ml de acuerdo a un protocolo de tratamiento consistente en una dosis de carga de 3 inyecciones mensuales seguidas de un régimen tipo TE y un período mínimo de seguimiento de 1 año. Dicho estudio trata de dar respuesta a los objetivos propuestos mediante la descripción de las características demográficas, oculares y sistémicas de los pacientes de la muestra y de los cambios funcionales y anatómicos objetivados con el tratamiento. Se realizará además un subanálisis de los datos, dividiendo la muestra según los tipos de complejo neovascular.

Un análisis preliminar de estos datos con 30 pacientes ya ha sido publicado (Castro - Navarro V, Cervera - Taulet E, Montero - Hernández J, Navarro - Palop C. *Treat - and - extend approach with aflibercept: Effects on different subtypes of age-related choroidal neovascularization*. Arch Soc Esp Oftalmol.2016 Nov 2. pii: S0365-6691(16)30187-3. doi: 10.1016/j.oftal.2016.09.005.) y los resultados que conforman esta tesis con 37 pacientes han sido aceptados para su publicación en la revista Ophthalmologica (Castro - Navarro V, Cervera - Taulet E, Montero - Hernández J, Navarro - Palop C. *One year outcomes of treat-and-extend approach with aflibercept in*

*age - related macular degeneration: effects on typical choroidal neovascularization and retinal angiomatous proliferation.*).

#### 4.1.1 Análisis descriptivo

##### *Sexo, edad y ojo afectado*

El grupo de muestra global lo forman 37 ojos de 37 pacientes diferentes con una edad media de  $78,70 \pm 7,64$  (y un rango que oscila entre los 65 y los 90 años). La muestra cuenta con 26 mujeres y 11 hombres. Con respecto al ojo afectado, vemos la patología en 16 ojos derechos y 21 ojos izquierdos.

Al realizar un subanálisis de los pacientes en función del tipo de complejo neovascular, objetivamos que el grupo de NVC de tipo oculto presenta una edad algo inferior, no obstante, no hay cambios significativos en cuanto a la edad media basal en los diferentes subgrupos. Tampoco se encuentran cambios significativos con respecto a la distribución por sexos o por ojo afectado (Tabla 4.1).

	EDAD		SEXO		OJO AFECTADO	
	MEDIA	D.E	HOMBRE	MUJER	DCHO	IZQDO
NVC TIPO 1	77.5	9.19	3	9	3	9
NVC TIPO 2	79.45	8.11	5	6	5	6
NVC MIXTA	79.16	5.52	2	4	3	3
RAP	69.12	6.91	1	7	4	4

**Tabla 4.1:** Edad, sexo y ojo afectado. *NVC: Neovascularización coroidea; RAP: Proliferación angiomatosa retiniana; D.E:Desviación estándar; DCHO: derecho; IZQDO: Izquierdo.*

##### *Comorbilidades sistémicas y oculares*

Con respecto a las patologías sistémicas objetivamos un predominio de HTA que afecta al 51 % de la muestra (n = 19), seguido de la dislipemia presente en el 32 % (n = 12), de la diabetes mellitus 13% (n = 5) y la cardiopatía 13% (n = 5). Ninguno de nuestros pacientes presentaba antecedentes de accidente cerebrovascular. Un 24% de los mismos tomaba medicación antiagregante o anticoagulante.

Con respecto a la patología ocular un 13% ( $n = 5$ ) de los pacientes recibía tratamiento tópico hipotensor por un aumento crónico de la presión intraocular o patología glaucomatosa.

La figura muestra la presencia de patologías según el tipo de componente neovascular (Figura 4.2):

	PATOLOGÍA SISTÉMICA					PATO. OCULAR
	HTA	DL	DM	CARDIOPATÍA	ANTIAGR./ANTICOAG.	PIO↑
NVC TIPO 1	7	4	2	1	4	2
NVC TIPO 2	8	5	1	1	3	2
NVC MIXTA	1	0	0	1	0	0
RAP	3	3	2	2	2	1

Tabla 4.2: Comorbilidades según el subtipo neovascular. *NVC: Neovascularización coroidea; RAP: Proliferación angiomasosa retiniana; HTA: Hipertensión arterial; DL: Dislipemia; DM: diabetes mellitus; ANTIAGREG: Antiagregante; ANTICOAG: Anticoagulante; PIO: Presión intraocular; PATO: Patología.*

#### *Tipo de lesión y localización de la misma*

Con respecto al tipo de complejo neovascular encontramos un predominio de las membranas neovasculares tipo 1 (32.4%;  $n = 12$ ) y 2 (29.7%;  $n = 11$ ) y una menor presencia de las NVC tipo mixta (16.2%;  $n = 6$ ) y de las RAP (21.6%;  $n = 8$ ) (Figura 4.1).

### Subtipo neovascular

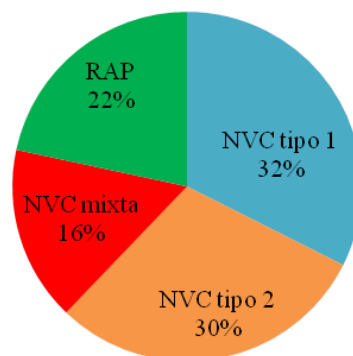


Figura 4.1: Distribución de los subtipos neovasculares *NVC: Neovascularización coroidea; RAP: Proliferación angiomasosa retiniana.*

La localización más frecuente de las membranas neovasculares es subfoveal (51.3%; n = 19), seguida de la localización yuxtafoveal (32.4%; n = 12). Únicamente un 16.2% (n = 6) de los pacientes presenta el componente neovascular a nivel extrafoveal (Figura 4.2).

## Localización

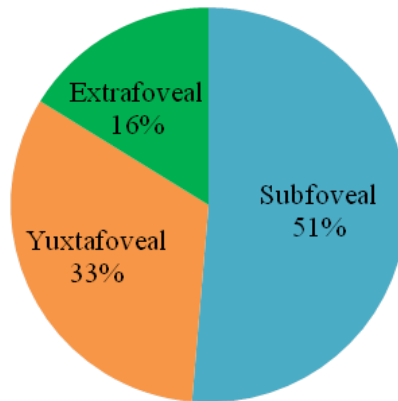


Figura 4.2: Localización de los subtipos neovasculares.

Si analizamos los datos en relación al subtipo neovascular vemos que las membranas neovasculares tipo 1 son más frecuentes a nivel subfoveal (58.3%; n = 6) o yuxtafoveal (33.3%; n = 4) que a nivel extrafoveal (8.3%; n = 1). Las membranas neovasculares tipo 2 también predominan a nivel subfoveal (72.7%; n = 8), en lugar de a nivel yuxtafoveal (18.1%; n = 2) o extrafoveal (9%; n = 1). Los complejos neovasculares de tipo mixto se encuentran por debajo de la depresión foveal en el 66.6% (n = 4) y por fuera de la misma en el 33.3% (n = 2). Dentro de su localización por fuera de la fovea, se encuentran a nivel yuxtafoveal en el 16.6% (n = 1) y en una la zona extrafoveal en el 16.6% (n = 1), respectivamente. Los complejos neovasculares tipo RAP se localizan únicamente por fuera de la fovea estando presentes en el 62.5% (n = 5) a nivel yuxtafoveal y en el 37.5% (n = 3) en una zona extrafoveal.

### *Degeneración macular asociada a la edad exudativa ojo contralateral*

Con respecto al porcentaje de bilateralidad, el 40.5% (n = 15) de los pacientes había presentado con anterioridad DMAE exudativa en el ojo adelfo en el momento del inicio del estudio (p = 0.81). Al finalizar el mismo, se objetivó la presencia de componente exudativo en el ojo contralateral en dos pacientes más, uno de ellos englobado dentro del grupo de NVC tipo 1 y otro de ellos en el grupo de NVC tipo 2 (Tabla 4.3).

	NVC TIPO 1		NVC TIPO 2		NVC MIXTA		RAP		P- VALOR
	BASAL	12M	BASAL	12M	BASAL	12M	BASAL	12M	
AFECCIÓN OJO CONTRALATERAL (Si/No)	6 / 6	7 / 5	5 / 6	6 / 5	2 / 4	2 / 4	2 / 6	2 / 6	0.81

Tabla 4.3: Afectación bilateral en los subtipos neovasculares. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana; *M*: Meses.

### Número de inyecciones

El número medio de inyecciones administradas durante este año de seguimiento es de  $7,892 \pm 1,22$ , con un rango que oscila entre 6 y 10.

No se objetivan diferencias significativas en el número de inyecciones entre los diferentes subtipos de complejo neovascular (Tabla 4.4).

	TIPO 1	TIPO 2	MIXTA	RAP
N INYECCIONES	7.66±1.55	8.63±0.92	7.66±1.0	7.37±0.7
N VISITAS	6.33±2.1	6.9±1.9	5.83±1.6	7.25±1.4

Kruskal-Wallis			Pairwise Wilcoxon test					
Statistic	statistic	p-value	TIPO 1	TIPO 1	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 2	MIXTA
			-	-	-	-	-	-
			TIPO 2	MIXTA	RAP	MIXTA	RAP	RAP
NUM. INYECCIONES	7.066126	0.06981972	0.46	1	1	0.304	0.051	1
NUM. VISITAS	2.773812	0.4278292	1	1	1	1	1	0.88

Tabla 4.4: Número de de inyecciones y visitas según el subtipo neovascular. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana; *N/NUM*: Número.

### Número de visitas

El número medio de visitas durante el estudio es de  $6,62 \pm 1,84$  (rango de 3 - 9) y es similar en todos los subtipos de proceso neovascular (Tabla 4.4).

### 4.1.2 Análisis estadístico

#### Agudeza visual

Durante el primer año de tratamiento se encuentra una mejoría gradual de la AV; partiendo de valores iniciales de  $0,6 \pm 0,27$  logMAR pasa a  $0,4 \pm 0,34$  logMAR al finalizar al estudio ( $p = 0.032$ ) (Figura 4.3).

No se objetivan diferencias significativas en función de los tipos de complejo neovascular, aunque las NVC tipo 1 parten con la mejor visión basal mientras que las NVC tipo 2 presentan la peor AV al inicio. En todos los grupos se produce una mejoría final de la visión (Figura 4.4).

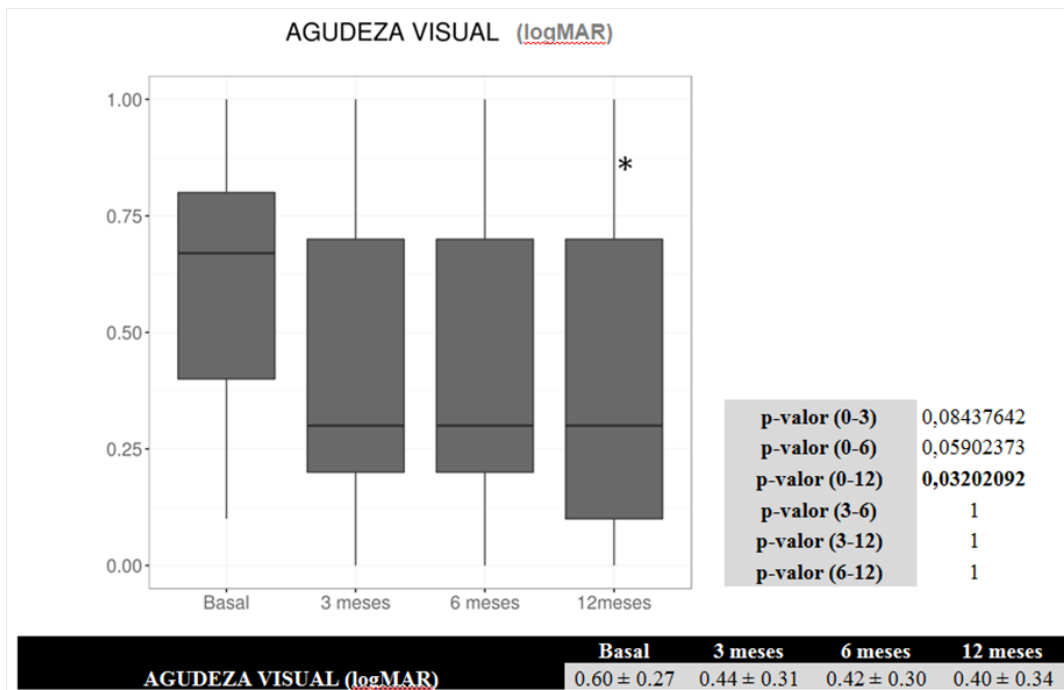


Figura 4.3: Agudeza visual

Un 43% del total de pacientes analizados consigue mejorar  $\geq 3$  líneas ETDRS, siendo este porcentaje del 25% para las NVC tipo 1, del 45% para las NVC tipo 2, del 50% para las NVC de tipo mixto y del 63% para las RAP (Figura 4.5).

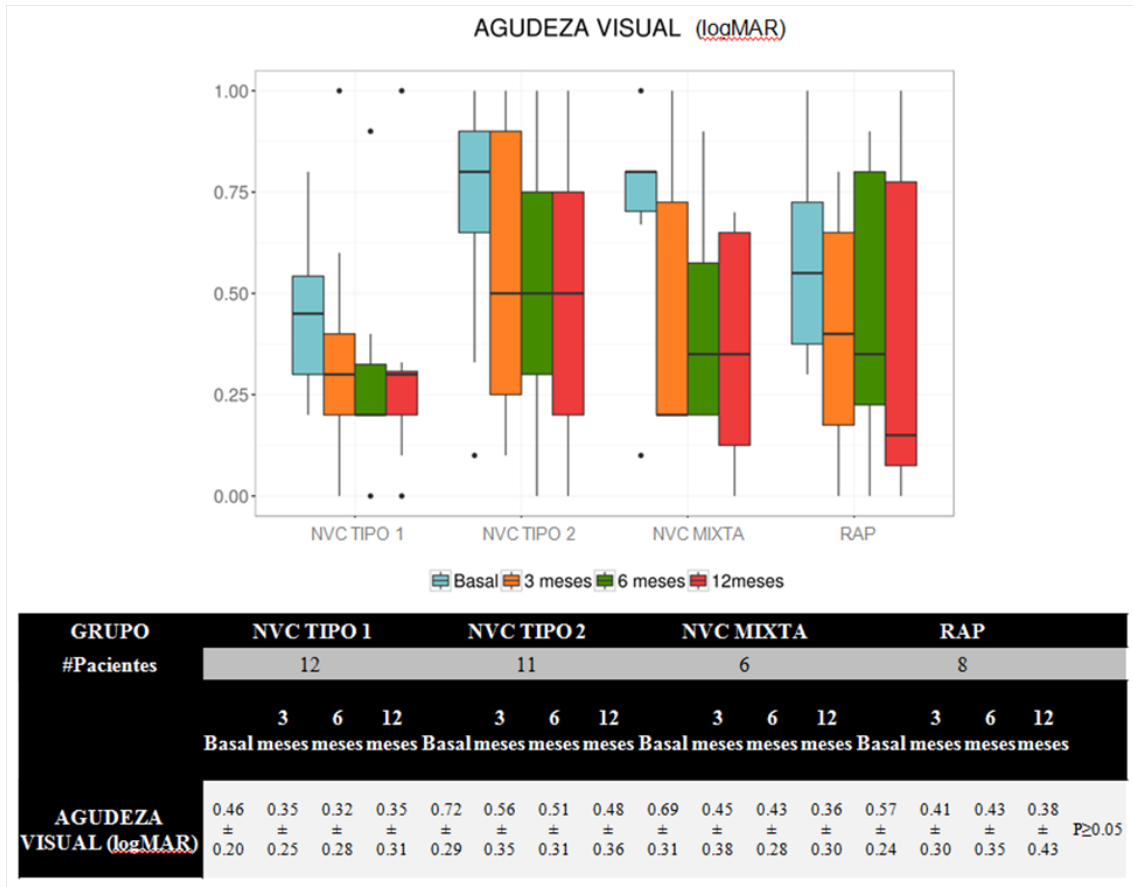


Figura 4.4: Agudeza visual según subtipos neovasculares. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana.

	Líneas ETDRS	GENERAL	NVC TIPO 1	NVC TIPO 2	NVC MIXTA	RAP	p-value
Basal - 3 meses	>1	20 (54%)	6 (50%)	6 (55%)	3 (50%)	5 (63%)	0,9522
	>2	16 (43%)	6 (50%)	4 (36%)	3 (50%)	3 (38%)	0,888
	>3	11 (30%)	2 (16%)	3 (27%)	3 (50%)	3 (38%)	0,5015
3 meses - 6 meses	>1	9 (24%)	3 (25%)	2 (19%)	1 (17%)	2 (25%)	0,7669
	>2	7 (19%)	3 (25%)	1 (9%)	1 (17%)	3 (38%)	0,7621
	>3	4 (11%)	1 (8%)	1 (9%)	1 (17%)	1 (13%)	0,9528
6 meses - 12 meses	>1	10 (27%)	2 (16%)	2 (19%)	3 (50%)	3 (38%)	0,3832
	>2	4 (11%)	0 (0%)	1 (9%)	2 (33%)	1 (13%)	0,2085
	>3	3 (8%)	0 (0%)	1 (9%)	1 (17%)	1 (13%)	0,6107
Basal - 12 meses	>1	25 (68%)	6 (50%)	8 (73%)	5 (83%)	6 (75%)	0,4518
	>2	20 (54%)	6 (50%)	6 (55%)	3 (50%)	5 (63%)	0,9522
	>3	16 (43%)	3 (25%)	5 (45%)	3 (50%)	5 (63%)	0,409

Tabla 4.5: Ganancia de agudeza visual en líneas ETDRS. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana.

**Hallazgos en retinografía**

En la muestra general, al finalizar el año de tratamiento, encontramos un menor número de hemorragias retinianas y de exudados a nivel macular. No se observaron cambios con respecto al número de pacientes que presentan drusas duras o blandas. Se produce un aumento de la atrofia y de la fibrosis macular que únicamente es estadísticamente significativo en este último parametro (Tabla 4.6).

	BASAL	12 MESES	p-VALOR (0-12)
HEMORRAGIAS (Si/No)	14 / 23	3 / 34	<b>0,004722132</b>
EXUDADOS (Si/No)	4 / 33	1 / 36	0,357514953
ATROFIA (Si/No)	13 / 24	19 / 18	0,240540756
FIBROSIS (Si/No)	2 / 35	11 / 26	<b>0,01225973</b>
DRUSAS DURAS (Si/No)	20 / 17	20 / 17	1
DRUSAS BLANDAS (Si/No)	7 / 30	7 / 30	1

Tabla 4.6: Hallazgos en retinografía

	NVC TIPO 1		NVC TIPO 2		NVC MIXTA		RAP		p-VALOR
	BASAL	12M	BASAL	12M	BASAL	12M	BASAL	12M	
HEMORRAGIAS (Si/No)	3 / 9	0 / 12	4 / 7	2 / 9	1 / 5	0 / 6	6 / 2	1 / 7	>0.05
EXUDADOS (Si/No)	0 / 12	0 / 12	1 / 10	0 / 11	0 / 6	0 / 6	3 / 5	1 / 7	>0.05
ATROFIA (Si/No)	5 / 7	5 / 7	4 / 7	7 / 4	4 / 2	5 / 1	0 / 8	2 / 6	>0.05
FIBROSIS (Si/No)	0 / 12	3 / 9	1 / 10	5 / 6	1 / 5	2 / 4	0 / 8	1 / 7	>0.05
DRUSAS DURAS (Si/No)	6 / 6	6 / 6	7 / 4	6 / 5	4 / 2	4 / 2	3 / 5	4 / 4	>0.05
DRUSAS BLANDAS (Si/No)	4 / 8	4 / 8	1 / 10	1 / 10	0 / 6	0 / 6	2 / 6	2 / 6	>0.05

Tabla 4.7: Hallazgos en retinografía según el subtipo neovascular. *NVC: Neovascularización coroidea; RAP: Proliferación angiomasosa retiniana; M: Meses.*

Con respecto a las NVC tipo 1, se objetiva la resolución total de las hemorragias y la presencia de exudados, drusas duras o blandas o el desarrollo de atrofia permanece estable. Se desarrolla fibrosis en el 25 % de los pacientes (Tabla 4.7).

Los resultados en las NVC tipo 2 son más variables. El componente hemorrágico se objetiva en la visita final en el 18 % de los casos; y el porcentaje de pacientes con atrofia y fibrosis aumenta pasando del 36.3 % al 63.3 % y del 9 % al 45 %, respectivamente.

En las membranas de tipo mixto se objetiva un leve aumento del componente de atrofia (del 66.6 % al 83.3 %) y de la fibrosis (del 16.6 % al 33.3 %).

En los procesos neovasculares de tipo RAP se observa un cambio en la presencia de hemorragias y exudados que persisten, aunque en menor medida, en la visita final. El porcentaje de atrofia y de fibrosis aumenta.

### ***Hallazgos en tomografía de coherencia óptica***

#### **Grosor macular central**

Durante el estudio se objetiva una reducción del GMC que alcanza la significación estadística a los 3, 6 y 12 meses, pasando de valores iniciales de  $349,86 \pm 92,66\mu$  a valores finales de  $233,59 \pm 58,59\mu$  (Figura 4.5).

En todos los tipos de complejos neovasculares se observa un descenso del GMC al finalizar el estudio. Los tipos de NVC con mayor grosor retiniano inicial son las NVC tipo 2 ( $384,63 \pm 82,7\mu$ ) y las NVC tipo mixtas ( $381,16 \pm 45\mu$ ), seguidas de las RAP ( $336,87 \pm 72,7\mu$ ), y finalmente de las NVC tipo 1 ( $311 \pm 73,53\mu$ ) (Figura 4.6).

#### **Volumen macular**

Con respecto al VM, al valorar el total de ojos analizados se encuentra un descenso progresivo del mismo pasando de valores iniciales de  $8,81 \pm 1,0$  cc a  $7,17 \pm 1,33$  cc ( $p < 0.000001$ ) a los 3 meses, a  $7,05 \pm 0,66$  cc ( $p = 0.000001$ ) a los 6 meses y a  $6,95 \pm 0,56$  cc ( $p < 0.000001$ ) a los 12 meses.

De forma similar a lo acontecido con el GMC, durante el tratamiento con aflibercept se objetiva un descenso del VM que es mayor tras la dosis de carga (Figura 4.7).

#### **Líquido subretiniano**

El número de pacientes con LSR disminuye tras la dosis de carga (pasando de  $n = 29$  a  $n = 2$ ), hace un pequeño repunte no significativo a los 6 meses ( $n = 5$ ) y luego vuelve a disminuir ( $n = 1$ ) al finalizar el estudio (Figura 4.8).



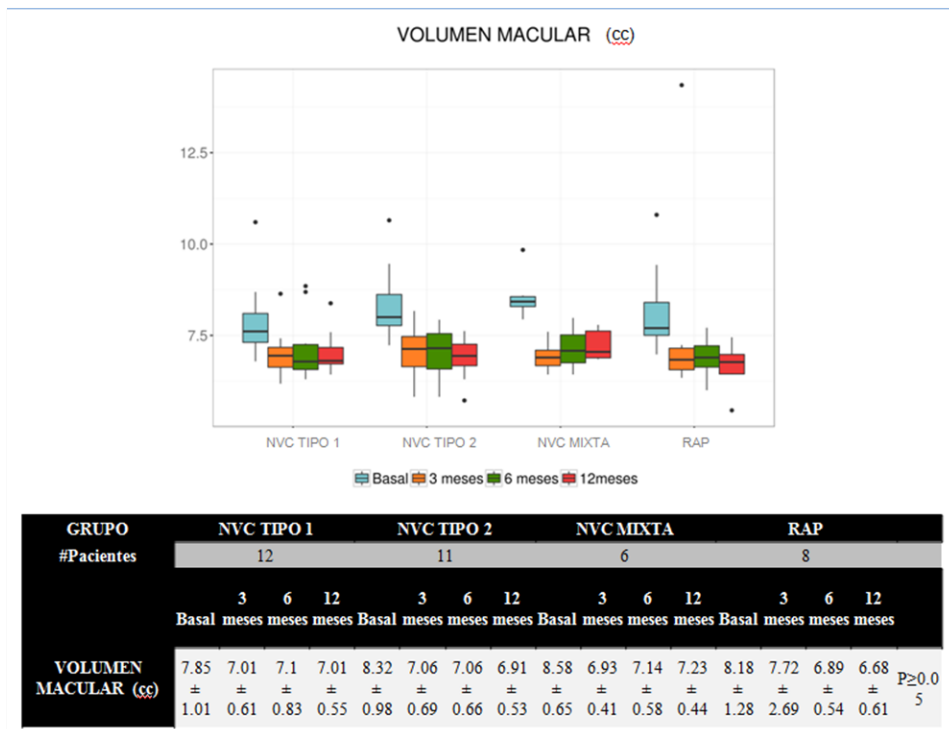


Figura 4.7: VM según el subtipo neovascular. NVC: Neovascularización coroidea; RAP: Proliferación angiomasosa retiniana.

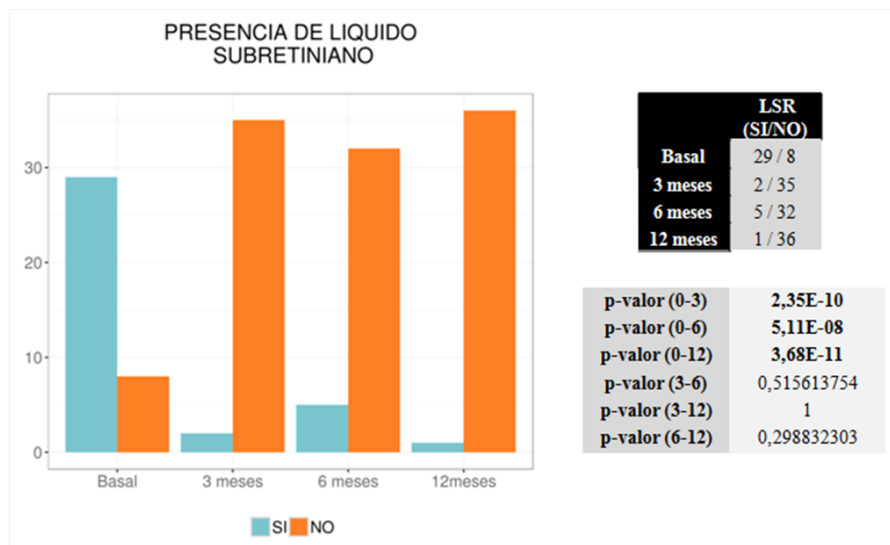


Figura 4.8: Presencia de LSR.

Por orden de frecuencia, las membranas neovasculares donde es más frecuente encontrar LSR en el momento del diagnóstico son las NVC tipo mixto 100% (n = 6), las NVC tipo 1 83.3% (n = 10), las RAP 75% (n = 6) y las NVC tipo 2 63.3% (n = 7). En todos los tipos se objetiva una disminución de la aparición de este parámetro exudativo al finalizar el año de tratamiento (Figura 4.9).

GRUPO #Pacientes	NVC TIPO 1				NVC TIPO 2				NVC MIXTA				RAP			
	12				11				6				8			
	3	6	12	12	3	6	12	12	3	6	12	12	3	6	12	12
LIQUIDO SUBRETINIANO (SI/NO)	10/2	0/12	2/10	1/11	7/4	0/11	2/9	0/11	6/0	0/6	0/6	0/6	6/2	2/6	1/7	0/8
QUISTES INTRARRETINIANOS (SI/NO)	4/8	0/12	1/11	0/12	7/4	1/10	3/8	1/10	5/1	0/6	2/4	2/4	6/2	2/6	1/7	0/8

Figura 4.9: Presencia de LSR y FIR según el subtipo neovascular. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasotica retiniana.

### Fluido intrarretiniano

Se produce una disminución estadísticamente significativa a los 3, 6 y 12 meses del número de pacientes con quistes intrarretinianos o FIR con respecto al número de pacientes con FIR a nivel basal (Figura 4.10).

Este hallazgo aparece a nivel basal en el 83,3% (n = 5) de las NVC tipo mixto, en el 75% (n = 6) de los RAP, en el 63.3% (n = 7) de las NVC tipo 2 y en el 50% de las NVC de tipo 1. Con el tratamiento se objetiva su desaparición total en las NVC tipo 1 y RAP, persistiendo en las NVC de tipo mixto en el 50% (n = 2) de los ojos y en las de tipo 2 en el 10% (n = 1) de los casos (Tabla 4.9).

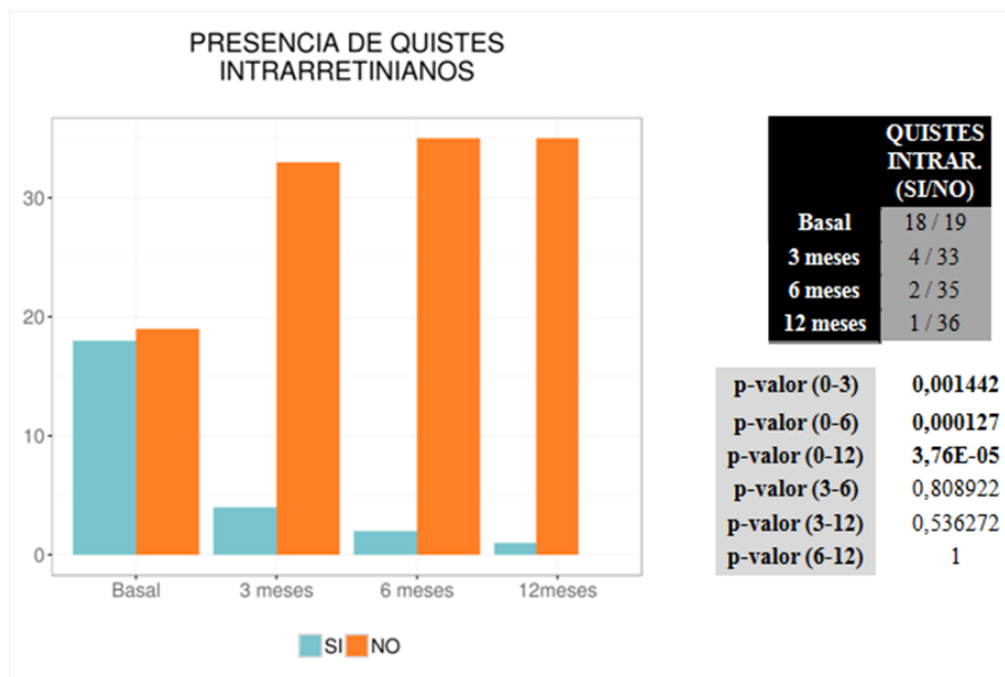


Figura 4.10: Presencia de FIR.

### Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina

Un 78.3% (n = 29) van a presentar un DEP ya sea seroso (n = 22) o fibrovascularizado (n = 7) en el momento del diagnóstico. Como indica la figura 4.8, con el tiempo, se va a producir

una disminución significativa del número de pacientes con DEP serosos y va a aumentar el porcentaje de pacientes con DEP fibroso pasando de un 18.9% (n = 7) inicial a un 24.3% (n = 9) en la visita final (Figura 4.8). Se ha medido la altura del DEP en su punto máximo, a nivel subfoveal y a 500μ nasales y temporales a la fóvea. Aunque en todas las localizaciones se ha objetivado un descenso en su altura, son los cambios a los 6 meses y a los 12 meses en el DEP máximo los que alcanzan la significación estadística. Las medidas de los DEP en las diferentes localizaciones en función del subtipo neovascular se encuentran en la siguiente imagen (Tabla 4.9).

	DEP SEROSO (SI/NO)	DEP FIBROSO (SI/NO)	MÁXIMO DEP (μ)	DEP SUB (μ)	DEP NAS (μ)	DEP TEMP (μ)
Basal	22 / 15	7 / 29	125.54 ± 122.14	69.83 ± 103.94	65.89 ± 87.90	68.37 ± 98.58
3 meses	3 / 34	17 / 20	59.62 ± 63.88	30.10 ± 45.32	25.67 ± 43.99	34.32 ± 53.28
6 meses	7 / 30	13 / 24	50.59 ± 73.65	24.75 ± 51.99	33.40 ± 56.53	23.51 ± 50.16
12 meses	3 / 34	9 / 28	34.51 ± 62.68	24.54 ± 53.57	17.02 ± 35.67	26.59 ± 52.60
p-valor (0-3)	<b>0,00001325</b>	0,146289558	0,06403321	0,906324831	0,452406273	0,570763188
p-valor (0-6)	<b>0,001436137</b>	0,379926209	<b>0,021486549</b>	0,20851981	0,594027313	0,109289632
p-valor (0-12)	<b>0,00001325</b>	0,778386721	<b>0,00111</b>	0,181335409	0,066239218	0,160717697
p-valor (3-6)	0,369684691	0,573419546	0,512178122	0,906324831	0,83015791	0,73552622
p-valor (3-12)	1	0,262092423	0,148402293	0,906324831	0,679153179	0,80616966
p-valor (6-12)	0,369684691	0,573419546	0,512178122	0,906324831	0,679153179	0,80616966

GRUPO #Pacientes	NVC TIPO 1				NVC TIPO 2				NVC MIXTA				RAP			
	12				11				6				8			
	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	
DEP SEROVASCULARIZADO (SI/NO)	6/6	1/11	1/11	0/12	3/8	0/11	0/11	0/11	3/3	2/4	1/5	1/5	6/2	1/7	0/8	0/7
DEP FIRBOVASCULARIZADO (SI/NO)	3/9	7/5	5/7	2/10	1/10	2/9	4/7	2/9	2/3	2/4	1/5	1/5	1/7	6/2	3/5	4/4

Tabla 4.8: Datos de presencia de DEP. NVC: Neovascularización coroidea; RAP: Proliferación angiomasosa retiniana; SUB: Subfoveal; NAS: Nasal; TEMP: Temporal.

Se objetivan cambios estadísticamente significativos (p = 0.03385) en la altura del DEP máximo a los 3 meses entre las NVC de tipo 2 y las RAP (Figura 4.11). El resto de análisis entre tipos de complejos neovasculares y entre los DEP medidos en diferentes localizaciones no es estadísticamente significativo.

GRUPO	NVC TIPO 1				NVC TIPO 2				NVC MIXTA				RAP			
#Pacientes	12				11				6				8			
	Basal	3 meses	6 meses	12 meses	Basal	3 meses	6 meses	12 meses	Basal	3 meses	6 meses	12 meses	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
MÁXIMO DEP (μ)	123.75 ± 120.75	59 ± 48.15	46.83 ± 60.60	23.58 ± 56.90	70.45 ± 109.64	21.27 ± 49.99	60.81 ± 91.49	24.72 ± 55.03	163.16 ± 110.65	62.33 ± 73.08	54.66 ± 84.84	61 ± 94.91	175.75 ± 137.92	111.25 ± 67.78	39.12 ± 68.38	44.5 ± 57.32
DEP SUB (μ)	62.91 ± 93.07	21.58 ± 40.15	30.5 ± 59.21	14.58 ± 50.51	38.45 ± 71.95	13.09 ± 29.40	12.90 ± 28.75	24.72 ± 55.03	71 ± 114.10	54 ± 61.84	54.5 ± 84.60	48.16 ± 76.21	122.5 ± 143.03	48.37 ± 51.13	10.12 ± 28.63	21.5 ± 40.24
DEP NAS (μ)	78.16 ± 85.13	34.16 ± 47.44	33.83 ± 48.12	21.25 ± 42.49	37.09 ± 84.63	17.72 ± 46.60	34.27 ± 62.14	13.27 ± 30.60	95.33 ± 118.03	45.5 ± 54.67	40.16 ± 62.72	32 ± 49.9	65 ± 76.55	9 ± 17.34	26.5 ± 66.15	4.62 ± 13.08
DEP TEMP (μ)	62.75 ± 77.00	26.91 ± 41.53	33.83 ± 48.12	10.16 ± 35.21	34.90 ± 64.26	4.90 ± 16.28	9.09 ± 30.15	18.45 ± 42.73	84.16 ± 104.25	58.33 ± 69.72	47.16 ± 73.64	50.5 ± 83.35	111 ± 151.32	67.87 ± 69.31	15.5 ± 32.36	44.5 ± 57.32

Tabla 4.9: Datos de DEP según la localización y el subtipo neovascular. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasitosa retiniana; *SUB*: Subfoveal; *NAS*: Nasal; *TEMP*: Temporal.

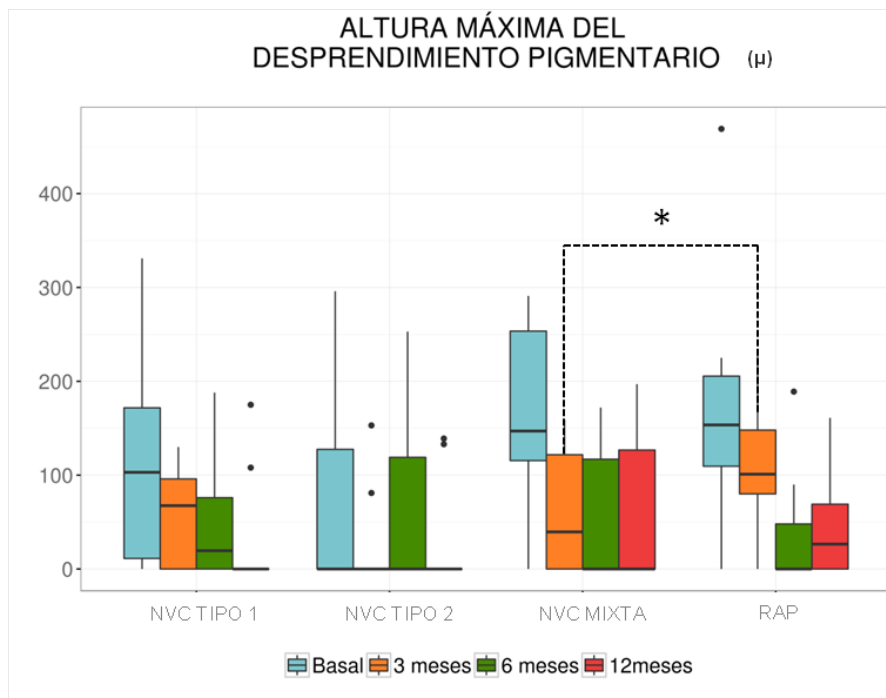


Figura 4.11: Altura máxima del DEP según el subtipo neovascular. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasitosa retiniana.

### Membrana limitante externa

Como indica la imagen (Tabla 4.10) en relación con la MLE se objetiva un aumento progresivo de su longitud. Partiendo de una longitud máxima inicial en las 2000 $\mu$  subfoveales de  $1657,45 \pm 233,88\mu$ , se observa que su longitud aumenta a los 3 meses ( $1728,45 \pm 205,4\mu$ ), a los 6 meses ( $1784,24 \pm 200,1\mu$ ) hasta alcanzar valores finales de  $1778,7 \pm 172,46\mu$ .

En el momento del diagnóstico, aunque de forma no significativa, se objetiva una mayor disrupción de esta capa en las NVC de tipo mixto con valores iniciales de  $1459,5 \pm 202,06\mu$  y una menor disrupción en los RAP con valores basales de  $1764,75 \pm 277,35\mu$ . Las NVC de tipo 1 y 2 ocupan puestos intermedios. En los diferentes subanálisis realizados a los 3, 6 y 12 meses se observa un aumento gradual en la longitud de la capa en los distintos subtipos de membranas siendo máximo en el análisis realizado a los 6 meses (Figura 4.12).

	MLE ( $\mu$ )	ZE ( $\mu$ )
<b>Basal</b>	1657.45 $\pm$ 233.88	1529.16 $\pm$ 282.10
<b>3 meses</b>	1728.45 $\pm$ 205.47	1639.16 $\pm$ 178.84
<b>6 meses</b>	1784.24 $\pm$ 200.10	1730.45 $\pm$ 187.69
<b>12 meses</b>	1778.70 $\pm$ 172.46	1731 $\pm$ 177.68
<b>p-valor (0-3)</b>	0,637523385	<b>0,047393616</b>
<b>p-valor (0-6)</b>	<b>0,048073273</b>	<b>0,00307</b>
<b>p-valor (0-12)</b>	<b>0,045409898</b>	<b>0,00278</b>
<b>p-valor (3-6)</b>	0,637523385	0,110535392
<b>p-valor (3-12)</b>	0,637523385	0,110535392
<b>p-valor (6-12)</b>	0,637523385	0,956837465

Tabla 4.10: Longitud de la MLE y de la ZE. *MLE: Membrana limitante externa; ZE: Capa de los elipsoides.*

### Capa de los elipsoides

Tal y como muestra la imagen (Figura 4.10, ya en los primeros 3 meses se observa un aumento en la longitud de la ZE estadísticamente significativo. A los 6 meses se objetiva una longitud de  $1730,45 \pm 187,69\mu$  y a los 12 meses la longitud es de  $1731 \pm 177,68\mu$ . Aunque no se encuentran diferencias significativas entre los tipos de membrana neovascular, se aprecia como las NVC de tipo 2 y mixto parten de ZE con peor integridad ( $1468,9 \pm 198,88\mu$  y  $1374,83 \pm 153,24\mu$ , respectivamente) frente a las NVC tipo 1 ( $1619 \pm 311,2\mu$ ) o las tipo RAP ( $1593 \pm 373,11\mu$ ). Al finalizar el estudio se objetiva un aumento en su longitud en todos los subtipos neovasculares (Figura 4.13).

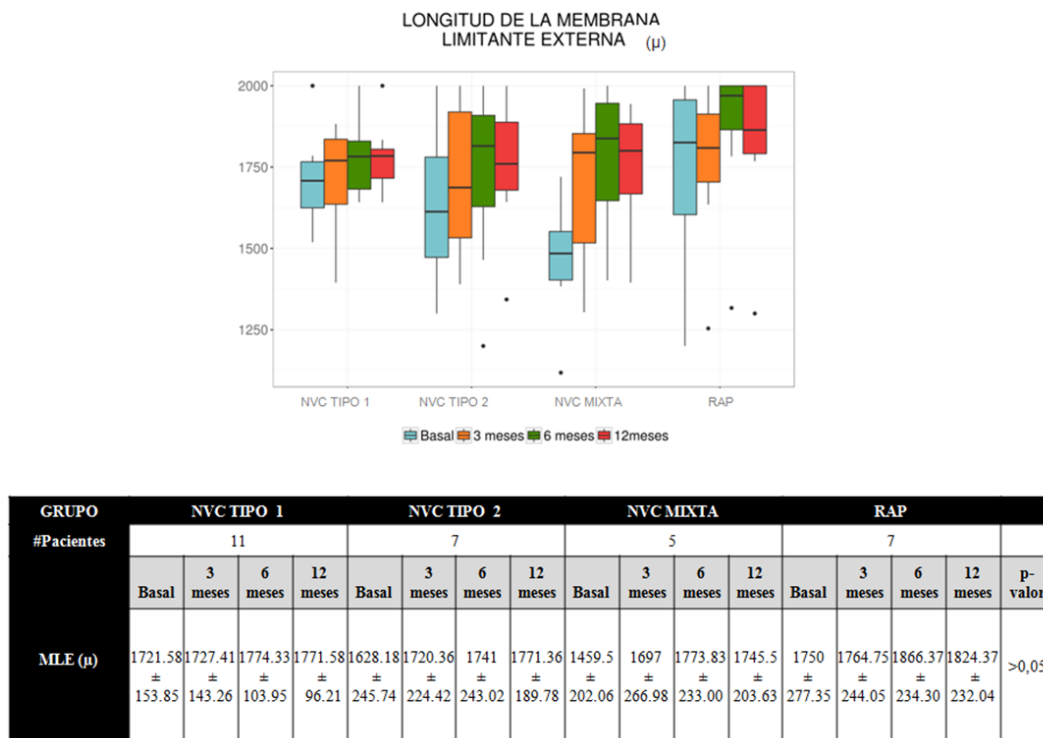


Figura 4.12: Longitud de la membrana limitante externa según el subtipo neovascular *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana.

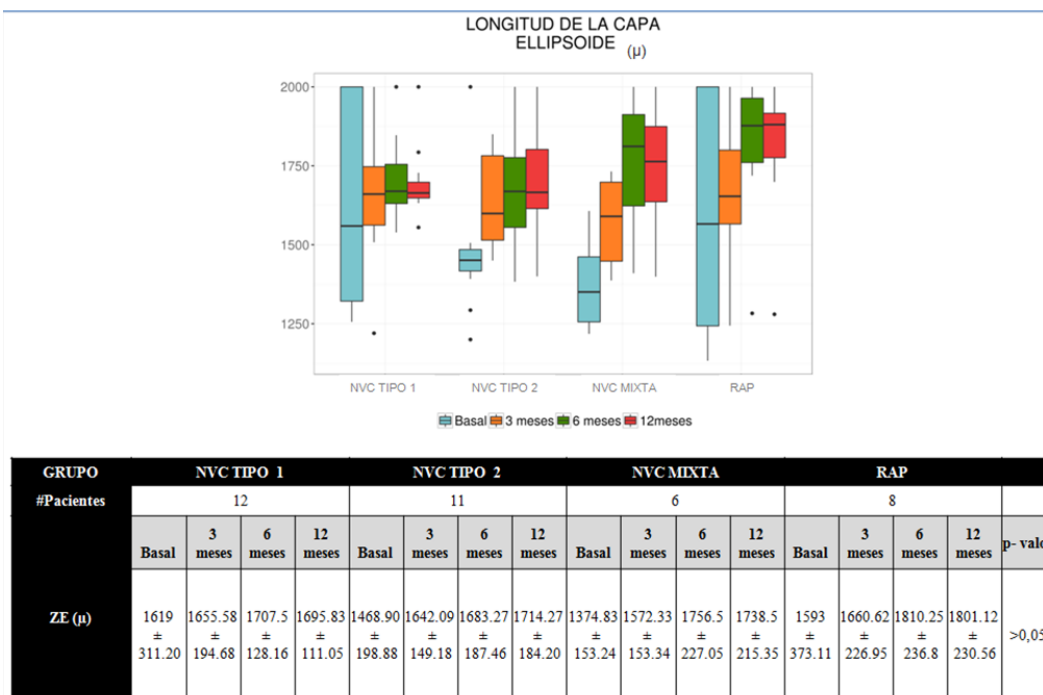


Figura 4.13: Longitud de la capa de los elipsoides (ZE) según el subtipo neovascular. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana.

## Grosor coroideo

De forma generalizada, al analizar el global de los ojos de estudios se encuentra un descenso del grosor coroideo en el área macular. En la región subfoveal, como indica la tabla 4.14, se pasa de valores iniciales de  $207,16 \pm 31,06\mu$  a valores finales de  $165,91 \pm 32,24\mu$ . En las localizaciones a  $500\mu$  nasales y temporales a la fovea se obtienen resultados similares como es posible ver en la tabla 4.14.

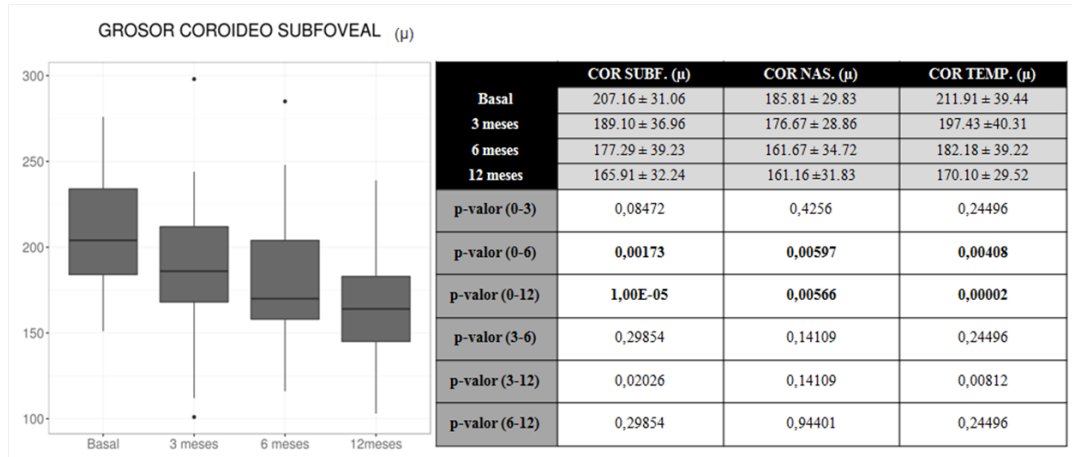


Figura 4.14: Grosor coroideo. *SUBF*: Subfoveal; *NAS*: Nasal; *TEMP*: Temporal.

Como se puede observar en las imágenes 4.11 y 4.12, al analizar los cambios en el grosor coroideo durante el estudio se encuentran un descenso progresivo del mismo en las diferentes localizaciones que es independiente del subtipo de complejo neovascular.

GRUPO	NVC TIPO 1				NVC TIPO 2				NVC MIXTA				RAP				
#Pacientes	12				11				6				8				
	Basal	3 meses	6 meses	12 meses	Basal	3 meses	6 meses	12 meses	Basal	3 meses	6 meses	12 meses	Basal	3 meses	6 meses	12 meses	p-valor
COR SUBF. ( $\mu$ )	208.33 $\pm$ 40.15	180.25 $\pm$ 34.83	171 $\pm$ 43.23	166.08 $\pm$ 33.68	195.18 $\pm$ 23.79	194.27 $\pm$ 27.44	198.45 $\pm$ 31.76	171.36 $\pm$ 16.23	208.33 $\pm$ 33.01	176.5 $\pm$ 41.89	157 $\pm$ 21.67	158 $\pm$ 41.50	221 $\pm$ 19.83	204.75 $\pm$ 46.9	172.87 $\pm$ 45.35	164.12 $\pm$ 43.05	>0.05
COR NAS. ( $\mu$ )	193.16 $\pm$ 30.34	172.25 $\pm$ 20.15	156.08 $\pm$ 36.74	156.5 $\pm$ 22.98	173.27 $\pm$ 22.31	179.36 $\pm$ 21.00	176.63 $\pm$ 23.8	167.45 $\pm$ 20.27	184.16 $\pm$ 44.71	165.16 $\pm$ 43.05	139.83 $\pm$ 27.52	163.5 $\pm$ 43.91	193.25 $\pm$ 24.22	188.25 $\pm$ 37.13	165.87 $\pm$ 43.54	157.75 $\pm$ 47.97	
COR TEMP. ( $\mu$ )	216.5 $\pm$ 43.59	190.25 $\pm$ 35.64	177.33 $\pm$ 38.39	172.58 $\pm$ 23.66	193.90 $\pm$ 34.09	197.54 $\pm$ 33.19	194.36 $\pm$ 32.77	172 $\pm$ 19.22	205.5 $\pm$ 50.89	188.66 $\pm$ 53.89	167.5 $\pm$ 33.33	158.66 $\pm$ 43.19	234.62 $\pm$ 18.30	214.62 $\pm$ 47.14	183.75 $\pm$ 52.99	172.37 $\pm$ 40.11	

Tabla 4.11: Grosor coroideo según el subtipo neovascular. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana; *SUBF*: Subfoveal; *NAS*: Nasal; *TEMP*: Temporal.

		COR SUBF.	COR NAS.	COR TEMP.
NVC TIPO 1	statistic	7,27895	12,99407	7,9488
	p-value	0,06352	<b>0,00465</b>	<b>0,04708</b>
	p-valor (0-3)	0,104594	<b>0,014942</b>	0,054375
	p-valor (0-6)	0,057183	<b>0,014942</b>	0,027927
	p-valor (0-12)	0,313615	0,308677	0,326327
	p-valor (3-6)	1	0,971405	0,770432
	p-valor (3-12)	1	0,506677	0,770432
	p-valor (6-12)	1	0,506677	0,710148
NVC TIPO 2	statistic	8,28425	2,17408	4,8479
	p-value	<b>0,04049</b>	0,53707	0,18328
	p-valor (0-3)	1	1	1
	p-valor (0-6)	0,17032	1	0,463475
	p-valor (0-12)	1	1	1
	p-valor (3-6)	0,100677	1	0,463475
	p-valor (3-12)	1	1	1
	p-valor (6-12)	0,17032	1	0,336432
NVC MIXTA	statistic	6,49732	4,30623	4,61568
	p-value	0,08977	0,23024	0,2022
	p-valor (0-3)	0,125896	0,432349	0,840504
	p-valor (0-6)	0,125896	1	0,55942
	p-valor (0-12)	0,54368	1	1
	p-valor (3-6)	1	1	1
	p-valor (3-12)	1	1	1
	p-valor (6-12)	1	1	1
RAP	statistic	8,63898	5,65952	9,10326
	p-value	<b>0,0345</b>	0,1294	<b>0,02795</b>
	p-valor (0-3)	0,119874	0,696159	0,107187
	p-valor (0-6)	0,0522	0,487398	<b>0,035286</b>
	p-valor (0-12)	0,854028	1	0,69263
	p-valor (3-6)	0,854028	1	0,69263
	p-valor (3-12)	0,375279	0,791769	0,451111
	p-valor (6-12)	0,214347	0,657033	0,210622

Tabla 4.12: Cambios estadísticos grosor coroideo según el subtipo neovascular. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana; *SUBF*: Subfoveal; *NAS*: Nasal; *TEMP*: Temporal.

### Correlaciones con la agudeza visual

Como se aprecia en la figura 4.13 se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa positiva entre la AV final en escala logMAR y el GMC, DEP máximo, DEP en las 500 $\mu$  nasales

y temporales. Se encuentra, así mismo, una correlación significativa negativa entre la longitud de la MLE y de la ZE con dicha variable.

	Correlación	IC	p-valor
<b>GMC (<math>\mu</math>)</b>	0,262140368	[ 0.105247960671696, 0.40629986536323 ]	<b>0,001288584</b>
<b>VM (cc)</b>	0,15156092	[ -0.0100281448508653, 0.305435811094682 ]	0,065941382
<b>DEP MAX. (<math>\mu</math>)</b>	0,225238141	[ 0.0663038325750057, 0.373025927319177 ]	<b>0,005916629</b>
<b>DEP SUBF. (<math>\mu</math>)</b>	0,155035368	[ -0.0064703231703721, 0.308658427037738 ]	0,059905676
<b>DEP NAS. (<math>\mu</math>)</b>	0,228493178	[ 0.0697196165902208, 0.375976289945021 ]	<b>0,005218612</b>
<b>DEP TEMP. (<math>\mu</math>)</b>	0,17611696	[ 0.0152051793487213, 0.328136671764965 ]	<b>0,032261616</b>
<b>MLE (<math>\mu</math>)</b>	-0,422969719	[ -0.546985334374737, - 0.280787838078456 ]	<b>8,53E-08</b>
<b>ZE (<math>\mu</math>)</b>	-0,502121411	[ -0.613743329978214, - 0.370819188472491 ]	<b>7,93E-11</b>
<b>COR SUBF. (<math>\mu</math>)</b>	0,064415332	[ -0.0979464694305894, 0.223436989438737 ]	0,436680976
<b>COR NAS. (<math>\mu</math>)</b>	0,013981765	[ -0.147695258446149, 0.174930985242276 ]	0,866062885
<b>COR TEMP. (<math>\mu</math>)</b>	0,070134175	[ -0.0922535826974167, 0.228887985038279 ]	0,396979341

Tabla 4.13: Correlación entre los distintos factores y la agudeza visual *GMC: Grosor macular central; VM: Volumen macular; DEP: Desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina; MLE: Membrana limitante externa; ZE: Capa de los elipsoides; COR: Coroides SUBF: Subfoveal; NAS: Nasal; TEMP: Temporal.*

## 4.2 Resultados: Estudio experimental

A continuación exponemos los resultados obtenidos en la realización de un estudio prospectivo, no aleatorizado en que se realiza el análisis y cuantificación de exosomas plasmáticos en dos cohortes de pacientes:

- **Pacientes caso:** Pacientes que han sido diagnosticados de NVC - naive secundaria a un proceso DMAE exudativa subsidiarios del tratamiento con antiVEGF, previo al inicio del tratamiento con dichos fármacos conforme a la práctica clínica habitual.
- **Pacientes controles:** Pacientes pendientes de ser intervenidos de cirugía de catarata, que en la exploración oftalmológica prequirúrgica se objetiva ausencia de patología retiniana.

### 4.2.1 Análisis descriptivo

#### *Sexo y edad*

En el grupo de los controles se han incluido 8 pacientes, siendo 5 de ellos mujeres y 3 hombres. Presentan una edad media de  $73,25 \pm 7,74$  años. Se han analizado 14 resultados de pacientes con DMAE previo al inicio de tratamiento siendo 7 mujeres y 7 hombres. Este grupo presenta una edad media de  $77 \pm 9,51$  años ( $p \geq 0,05$ ).

#### *Exosomas plasmáticos*

Tal y como se puede apreciar en la figura 4.15, de forma generalizada, al analizar la cuantificación global de exosomas plasmáticos se observa mayor cantidad de exosomas en plasma en los pacientes casos con DMAE exudativa ( $2000000 \pm 1185919,973$  / mL) que en los pacientes controles sanos ( $1510000 \pm 511981,009$  / mL) ( $p = 0.285882412$ ).

La figura 4.16, muestra en un análisis pormenorizado los valores de exosomas plasmáticos en cada uno de los pacientes incluidos en el estudio.

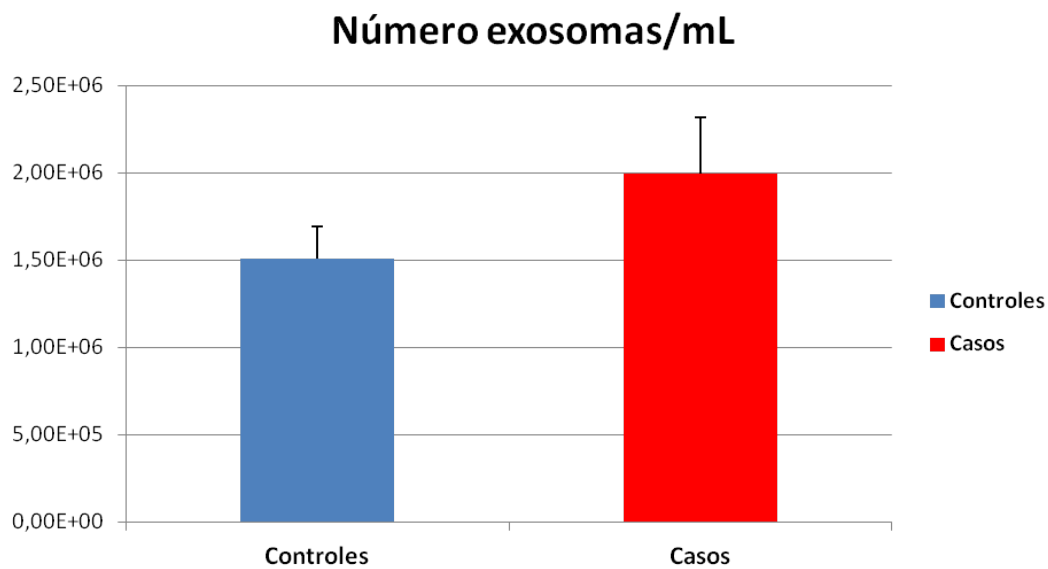


Figura 4.15: Número de exosomas / mL.

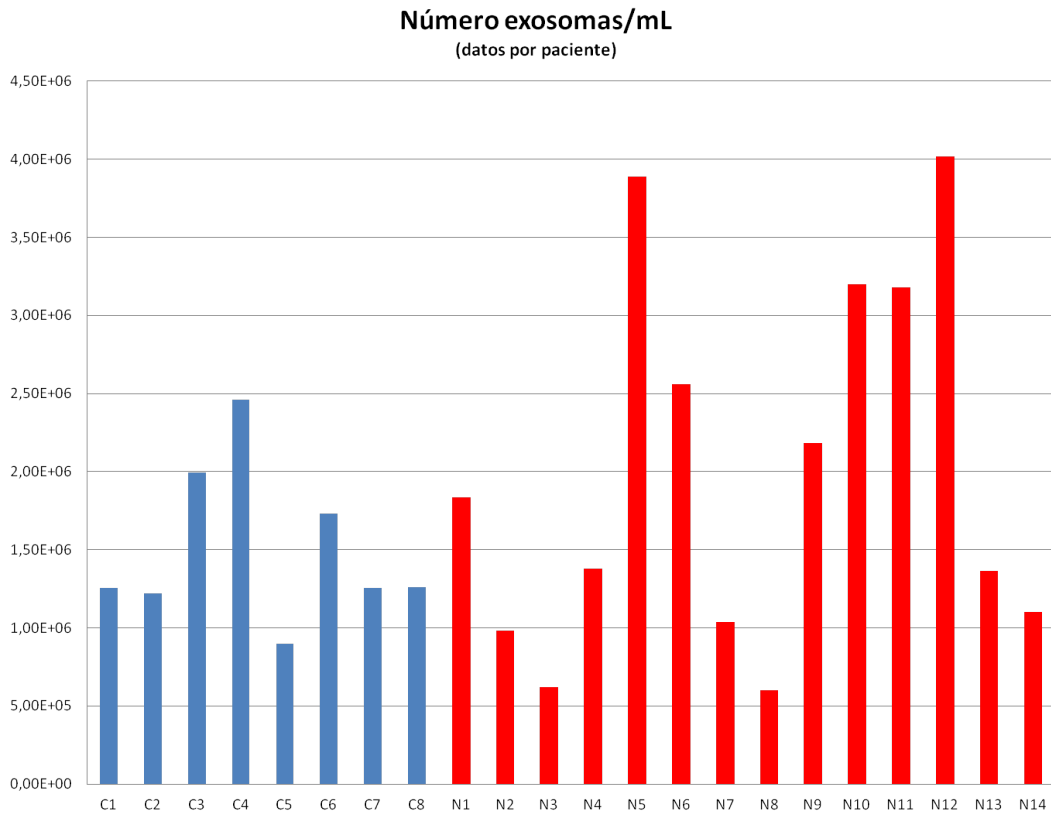


Figura 4.16: Número de exosomas / mL en cada paciente. *C*: Controles; *N*: Casos.

### *Exosomas plasmáticos CD9-RPE65*

El número total de exosomas CD9-RPE65 en pacientes controles es de  $101000 \pm 54509, 10755$  / mL y en pacientes con DMAE es de  $420000 \pm 288024, 3909$  / mL. El estudio de la cantidad de exosomas CD9-RPE65 con respecto de la cantidad global de exosomas plasmáticos en cada una de las cohortes encuentra un mayor porcentaje de exosomas CD9-RPE65 en pacientes con DMAE exudativa ( $21,67 \pm 12,88\%$ ) con respecto a pacientes controles sanos ( $7,09 \pm 3,48\%$ ), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.005574114$ ) (Figura 4.17).

La figura 4.18 muestra el porcentaje de estos exosomas en cada uno de los pacientes.

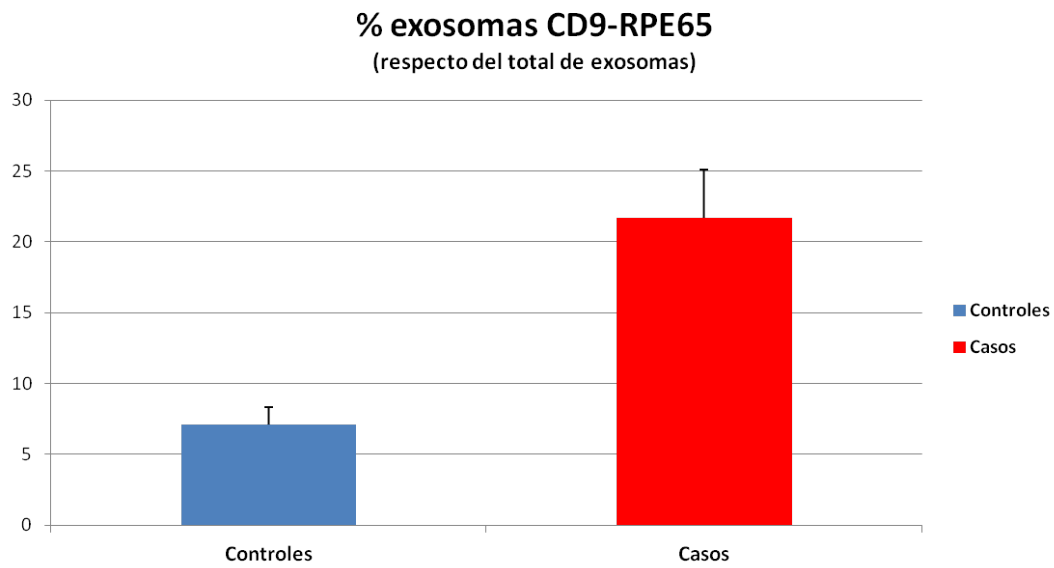


Figura 4.17: Porcentaje de exosomas / mL.

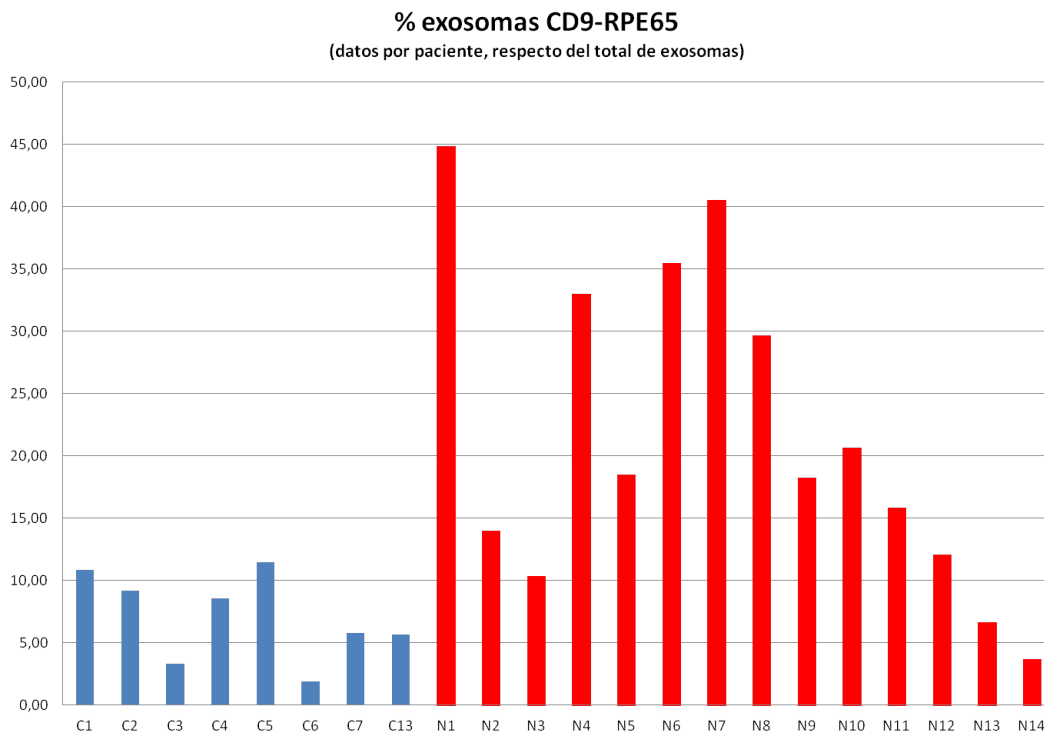


Figura 4.18: Porcentaje de exosomas CD9RPE65 / mL en cada paciente. *C*: Controles; *N*: Casos.

# Capítulo 5

## Discusión

### 5.1 Estudio clínico

#### 5.1.1 Factores demográficos y efectividad del régimen tratar y extender con aflibercept

En la actualidad la inmensa mayoría de los pacientes con DMAE exudativa son tratados con inyecciones intravítreas de fármacos con acción antiVEGF. Los principales estudios clínicos randomizados que evalúan el efecto de estos fármacos en la DMAE valoran la eficacia del tratamiento principalmente en base a datos funcionales como la AV o la ganancia de letras y de cambios anatómicos tales como el grosor retiniano, el VM o la presencia o ausencia de FIR, LSR o DEP. Nuestro estudio presenta la fortaleza de valorar la eficacia del tratamiento con aflibercept apoyándose en las principales variables funcionales (AV y ganancia de letras) y en un gran número de variables anatómicas (GMC, VM, tipo de DEP, altura de DEP en diferentes localizaciones, presencia o ausencia de FIR o LSR, y grosor coroideo en diferentes localizaciones) lo que nos va a permitir la ventaja frente a estudios previos del a) análisis de cada uno de estas variables en el primer año de tratamiento con el fármaco, b) subclasificación de los complejos neovasculares, c) realizar correlaciones de los distintos factores con la agudeza visual.

Tres estudios clínicos fundamentales en el conocimiento de la eficacia y seguridad de los fármacos antiVEGF son:

- Estudios clínicos randomizados como el MARINA [Rosenfeld et al. 2006] o el ANCHOR [Brown et al. 2006] mostraron grandes mejorías de AV en pacientes con neovascularización activa secundaria a la DMAE tratados con ranibizumab frente al tratamiento con terapia fotodinámica o con placebo.
- Posteriormente, el estudio CATT [Martin et al. 2011] mostró la no inferioridad en los primeros dos años de bevacizumab en una pauta de tratamiento mensual o según necesidad comparado con ranibizumab en el tratamiento de esta misma enfermedad.
- Más recientemente, los resultados obtenidos a través de los estudios clínicos randomizados VIEW 1 y VIEW 2 [Heier et al. 2012] han mostrado que aflibercept administrado cada 8 semanas conseguía ganancias visuales equivalentes a las conseguidas con ranibizumab cada 4 semanas.

Como hemos comentado anteriormente, en los estudios VIEW 1 (con pacientes de EEUU y Canadá) y VIEW 2 (con pacientes de Europa, Oriente medio, Asia y Latinoamérica) [Heier et al. 2012] se realizó una randomización 1:1:1:1 a 4 grupos de tratamiento que fueron los siguientes:

- 0.5 mg aflibercept cada 4 semanas (0.5q4).
- 2 mg aflibercept cada 4 semanas (2q4).
- 2 mg aflibercept cada 8 semanas (2q8) después de 3 inyecciones en la semana 0, 4 y 8.
- 0.5 mg ranibizumab cada 4 semanas (Rq4).

Los pacientes eran examinados mensualmente hasta la semana 52 y recibían tratamiento intravítreo en todas las visitas, salvo en el grupo de aflibercept bimensual (2q8) donde, a partir del tercer mes, únicamente se administraba el tratamiento cada dos meses.

Con estos regímenes de tratamiento se obtuvieron los siguientes resultados:

- La distribución por sexos en estos estudios presenta un mayor número de mujeres con respecto de hombres dentro de los pacientes incluidos en el estudio (aproximadamente un 60 % vs un 40 %). Nuestra distribución también presenta un mayor número de pacientes del sexo femenino (70 % vs 30 %).

- La edad media de los pacientes incluidos en los ensayos randomizados era de entre 77.7 - 78.4 años en VIEW 1 y 73 - 74.7 años en VIEW 2; resultados muy similares a la edad media basal de nuestros pacientes de  $78,70 \pm 7,6$  años.
- Estos estudios no aportan datos sobre las comorbilidades previas de los pacientes, y realizan una subdivisión del complejo neovascular basándose en las características angiográficas de las lesiones [Group 1991]. Según esto, reflejan una mayor prevalencia de complejos neovasculares de tipo oculto (35.9% - 40.2%), seguidos del mínimamente clásico (32.2% - 36.2%) y del predominantemente clásico (23.3% - 28.8%).
- En cuanto a ganancia visual, se observó que en pacientes con una AV basal también similar a la nuestra de 54 - 55.7 letras EDTRS (unos 0.6 logMAR) en VIEW 1, y 51.6 - 53.8 letras ETDRS (unos 0.65 logMAR) en VIEW 2 se conseguían ganancias de visión de +8.3 letras ETDRS en 0.5q4, +9.3 letras ETDRS en 2q4, +8.4 letras ETDRS en 2q8 y +8.7 letras EDTRS en Rq4, no encontrándose cambios significativos entre los diferentes grupos. Nuestros pacientes parten de una AV de  $0.6 \pm 0.27$  logMAR (unas 55 letras ETDRS) y consiguen una mejoría visual de unas +10 letras EDTRS pasando a  $0,4 \pm 0,34$  logMAR en la visita final.
- Con respecto a los cambios anatómicos, se objetiva un descenso del GMC de entre 116 y  $129\mu$  (partiendo de valores basales de 313.2 -  $324.4\mu$ ) en el VIEW 1 y de entre 130 -  $157\mu$  (partiendo de valores basales de 325.9 y  $342.6\mu$ ) en el VIEW 2. Nosotros partimos de unos valores de GMC  $349,86 \pm 92,66\mu$  y conseguimos un descenso a valores finales de  $233.59 \pm 58.59\mu$  con una ganancia neta similar a la de los estudios publicados de  $-116.27\mu$ . Con respecto a la ausencia en la visita final de quistes intrarretinianos y de FIR en la OCT, en los estudios randomizados se observan tasas de 60.3% en 0.5q4, 72.4% en 2q4, 67.7% en 2q8 y de 62.0% en Rq4. Nuestros resultados, aunque de forma no combinada, reflejan que al finalizar el estudio en torno al 90% de nuestros pacientes presenta ausencia de FIR o LSR. Estos resultados parecen ir en consonancia con lo reflejado en recientes trabajos que suponen una mayor eficacia en la modificación de hallazgos morfológicos (resolución de FIR, LSR o DEP) de aflibercept frente a ranibizumab [Garcia-Layana et al. 2015; Schmidt-Erfurth et al. 2014a].
- El número medio de inyecciones administradas en los subgrupos mensuales donde se suponía, según el diseño del estudio, una administración de 13 inyecciones fue de 12.1 a 12.5 en el VIEW 1 y de 12.2 a 12.4 en el VIEW 2. El grupo de aflibercept bimensual, según

el esquema inicial de tratamiento, recibiría 3 inyecciones mensuales los primeros 3 meses seguidas de 5 inyecciones en los siguientes 10 meses; sin embargo, este grupo recibió una media de 7.5 inyecciones en el VIEW 1 y en el VIEW 2. Nuestro estudio se basa en el empleo de una estrategia de tratamiento de tipo TE en lugar de en la administración mensual o bimensual fija. A lo largo de estos 12 meses de seguimiento nuestros pacientes recibieron una media de  $7,89 \pm 1,22$  inyecciones y  $6,62 \pm 1,84$  visitas. Aunque no se objetivan grandes diferencias en cuanto al número de inyecciones administradas en este caso con respecto al empleo de un régimen fijo bimensual, el empleo de una estrategia TE nos permite un tratamiento individualizado de cada paciente y un menor número de recurrencias a la vez que intenta limitar el número de visitas necesarias y de sobretratamientos con respecto a los regímenes fijos de administración [Garcia-Layana et al. 2015; Haller 2013].

Al igual que sugieren nuestros datos, en los que encontramos una ganancia visual de  $0,6 \pm 0,27$  logMAR a  $0,4 \pm 0,34$  logMAR con una media de 7.89 inyecciones en el primer año mediante la aplicación de un protocolo de TE, publicaciones recientes han corroborado tanto en estudios clínicos randomizados [Berg et al. 2015; Berg et al. 2016; Wykoff et al. 2015], como en la práctica clínica real [Chae et al. 2015; Engelbert et al. 2009; Engelbert et al. 2010; Mrejen et al. 2015; Rayess et al. 2015] la eficacia de esta modalidad de tratamiento.

En un inicio, la administración mensual fija de tratamiento se consideró la primera opción terapéutica en la DMAE [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. No obstante, la sobrecarga asistencial y el hecho de que una gran cantidad de los pacientes pudieran estar sobretratándose ha llevado a la necesidad de descubrir otros regímenes de tratamiento que mantuvieran la ganancia visual objetivada en los regímenes fijos pero reduciendo el número de inyecciones y de visitas requeridas [Garcia-Layana et al. 2015; Haller 2013].

La efectividad del regimen conocido como « a necesidad » o PRN, ha sido evaluada en numerosos ensayos clínicos como el CATT [Martin et al. 2011], el PrONTO [Lalwani et al. 2009] (LalwaniGA2009) o el SUSTAIN [Holz et al. 2011], no obstante, este tipo de protocolo constituye una estrategia reactiva donde el paciente recibe el tratamiento una vez ya se han objetivado signos de recidiva de la actividad exudativa, por lo que, aunque disminuye el número de inyecciones y de tratamiento innecesarios, no tiene efecto sobre la incidencia de las recurrencias y puede conllevar un pronóstico visual final a largo plazo inferior a otros protocolos de tratamiento que se adelantan a la presencia de exudación [Singer et al. 2012]. Además, se ha visto que unas ganancias visuales similares a los regímenes fijos se consiguen sólo si se ha llevado un

correcto seguimiento mensual del paciente por lo que no supone una disminución en el número de visitas [Martin et al. 2012; Schmidt-Erfurth et al. 2014a] y, en muchas ocasiones, el empleo y la visualización de los biomarcadores clínicos de actividad en la OCT no se realiza en la práctica clínica con la misma rigurosidad que en los ensayos clínicos, por lo que puede conllevar un retraso en la administración del tratamiento [Schmidt-Erfurth et al. 2016].

El régimen de tratamiento TE tiene la filosofía de que con una menor repercusión sobre la calidad de vida del paciente y una menor sobrecarga asistencial (al intentar disminuir el número de visitas y de inyecciones necesarias) es capaz de conseguir ganancias visuales, reduciendo el número de recurrencias y de sobretratamientos con respecto a regímenes fijos [Freund et al. 2015]. Esto lo consigue con el esquema de tratamiento proactivo que utiliza. Esta modalidad se basa en un tratamiento inicial mensual hasta la ausencia de signos de exudación activa (valorados en base a criterios de AV, biomicroscopía del área macular, o hallazgos en la OCT o AGF). Siempre y cuando la visión se mantenga estable y no se objetiven signos de exudación, el intervalo de seguimiento se incrementa de manera secuencial cada dos semanas hasta un máximo de 10 o 12 semanas [García-Layana et al. 2015; Haller 2013; Schmidt-Erfurth et al. 2014a] o hasta un máximo de 2 semanas menos del periodo de extensión de la última recurrencia [Berg et al. 2015] y el paciente recibe tratamiento activo cada vez que es visitado. Si, por el contrario, en alguna de las visitas se objetivan signos de recidiva de la actividad exudativa el intervalo de tratamiento pasa de nuevo a un régimen mensual hasta que se consigan los parámetros necesarios para iniciar la extensión.

En la actualidad contamos con datos provenientes de ensayos clínicos randomizados que tratan de investigar si existen diferencias tanto funcionales como anatómicas al emplear este régimen de tratamiento. El estudio TREX-AMD [Wykoff et al. 2015] es un estudio prospectivo en que se comparan los resultados anatómicos y funcionales y el número de inyecciones y de visitas realizadas a 12 meses en 69 pacientes entre 0.5 mg de ranibizumab intravítreo conforme a un protocolo fijo mensual y 0.5 mg de ranibizumab intravítreo en un protocolo de TE. Los pacientes a estudio presentan unas características basales similares a nuestros pacientes (sexo femenino 63 %, edad media 77 años, diabetes mellitus en el 18 % e HTA en el 78 %) y otras algo diferentes (como una AV basal media de 0.5 logMAR y un GMC de  $511\mu$ ). Este estudio demuestra que con 10.1 inyecciones (rango de 7 - 13) en el grupo de TE frente a 13.0 inyecciones en el grupo mensual, consigue una ganancia visual media similar en ambos grupos (de +10.5 letras ETDRS en el grupo de TE y de +9.2 letras ETDRS en el grupo fijo mensual) en concordancia con los resultados del MARINA [Rosenfeld et al. 2006] o el ANCHOR [Brown et al. 2006] y una

reducción del GMC también similar con las dos opciones de tratamiento (  $-173 \mu$  para el TE y  $-246 \mu$  para el mensual fijo). Como hemos comentado, esta estudio presentan unas ganancias visuales similares a nuestros resultados, no obstante, puede llamar la atención que en 12 meses el número de inyecciones recibidas es mayor (10.1 frente a 7.89). Uno de los motivos de esta diferencia puede ser el empleo de diferentes fármacos antiVEGF [Wykoff et al. 2015], pues como hemos comentado anteriormente, aflibercept presenta mayor afinidad contra el VEGF-A [Frampton 2012] y una mayor vida media [Papadopoulos et al. 2012].

El estudio LUCAS [Berg et al. 2015] supone en la actualidad el estudio prospectivo sobre el régimen TE con mayor número de pacientes incluidos hasta la fecha. En él 441 pacientes han sido randomizados a 0.5 mg de ranibizumab frente a 1.25 mg de bevacizumab en un protocolo de tratamiento de TE con un intervalo máximo entre visitas de 12 semanas. Sus características basales incluyen una edad media de 78 años, una MAVC de 60 letras ETDRS (0.5 logMAR) y un GMC de  $361 \mu$ . A pesar de que en el primer año de tratamiento las ganancias visuales fueron similares en ambos brazos del estudio ( $+8.2$  letras ETDRS en el grupo de ranibizumab y  $+7.9$  letras EDTRS en el grupo de bevacizumab) fueron necesarias un menor número de inyecciones (8.0) en el grupo de ranibizumab con respecto al grupo de bevacizumab (8.9) y con el primer fármaco se obtuvo un mayor porcentaje de pacientes con ausencia de LSR o FIR al finalizar el estudio (65.2% vs 47%). En los resultados a 2 años de este estudio sobre 339 pacientes se mantuvieron estos resultados con una similar ganancia visual y un mayor número de tratamientos requeridos en el grupo de bevacizumab.

A pesar de que nuestros pacientes se asemejan en gran medida a las características basales de los pacientes incluidos en los ensayos clínicos randomizados, la práctica clínica diaria puede diferir en gran medida de los escenarios empleados en los ensayos clínicos. Es, por lo tanto, igual de importante ver los resultados obtenidos en un manejo habitual de esta pauta de tratamiento.

Rayess y colaboradores [Rayess et al. 2015] evaluaron los resultados de 212 ojos naive tratados con ranibizumab o bevacizumab en TE a 1, 2 y 3 años. Dentro de sus características basales destaca una edad media de 80.3 años, un 65 % de mujeres, un 11 % de diabetes mellitus y un 46 % de HTA. Partían de una MAVC basal media de  $0,83 \pm 0,57$  logMAR y un grosor macular basal de  $350,8 \pm 116,8 \mu$  y al año de tratamiento, tras una media de  $7,6 \pm 1,8$  inyecciones (rango de 5 - 13), la AV había mejorado a  $0,6 \pm 0,47$  logMAR (con una ganancia neta de  $+11.6$  letras ETDRS) y el GMC se había reducido a cifras de  $285 \pm 84,8 \mu$  a pesar de que un 52.4 % de los pacientes seguía presentando signos de actividad en la OCT. Los resultados a 2 y 3 años sobre estos pacientes aportaron similares conclusiones, destacando que con 5.7 inyecciones en el segundo año y con

5.8 en el tercero, las ganancias anatómicas y funcionales objetivadas a 1 año se mantenían. Son también estudios basados en la práctica clínica diaria los realizados por Mrejen y colaboradores [Mrejen et al. 2015] y Chae y colaboradores [Chae et al. 2015]. El primero de ellos es un estudio retrospectivo llevado a cabo sobre 210 ojos tratados con diferentes combinaciones de antiVEGF (59 % ranibizumab en monoterapia, 15.7 % ranibizumab y aflibercept, 14.3 % ranibizumab y bevacizumab, 5.7 % los tres agentes, 4.3 % bevacizumab en monoterapia y 1 % aflibercept en monoterapia) en un régimen de TE precedido de una dosis de carga de 3 inyecciones mensuales. Los pacientes fueron evaluados en condiciones basales, a los 3 meses, a los 6 meses y cada 6 meses hasta un periodo máximo de seguimiento de 6 años; resultando un periodo medio final de seguimiento de 3.5 años. Dentro de las características basales de los pacientes incluidos en este estudio, destacan: edad media de 81.1 años, un predominio del sexo femenino (67.6 %) y una tasa de 13.5 % de enfermedad bilateral activa en el momento del diagnóstico. Así mismo, los pacientes presentaban las siguientes comorbilidades: diabetes mellitus en un 10.8 %, HTA en un 61.1 %, dislipemia en un 37.3 %, un 50 % tomaba medicación antiagregante/anticoagulante (aspirina, clopidogrel o warfarina) y un 8.6 % presentaba antecedente de glaucoma.

Con respecto a los resultados funcionales, en este estudio los pacientes partían de una MAVC media de 0.657 logMAR y los autores resaltan que las ganancias obtenidas a los 6 meses (0.557 logMAR) se mantienen con el tratamiento al año (0.529 logMAR), a los 2 años (0.534 logMAR) y a los 3 años (0.544 logMAR), objetivando la mayor ganancia visual a los 18 meses de iniciar el estudio (0.520 logMAR) y una menor ganancia visual en aquellos pacientes que partían de peores AV. El número medio de inyecciones administradas por año fue de  $8,3 \pm 1,6$  (rango de 4 a 13).

Nuestros resultados concuerdan con la gran mayoría de los resultados expuestos con anterioridad. Nuestra edad media basal es similar a la objetivada tanto en los estudios randomizados como en los estudios retrospectivos, y en nuestros pacientes la distribución por sexos presenta un 70 % de mujeres. En relación con la incidencia de otras comorbilidades en nuestros pacientes, encontramos tasas similares a las publicadas por Mrejen y colaboradores [Mrejen et al. 2015] con un predominio de la HTA (51 %) y la dislipemia (32 %) sobre la diabetes mellitus (13 %). Encontramos diferencias en cuanto al porcentaje de pacientes en tratamiento antiagregante o anticoagulante que es menor en nuestra serie; por el contrario, el número de pacientes con antecedentes de patología glaucomatosa al inicio del estudio se sitúa en el 13 %.

Aunque partimos de una MAVC similar a la basal de los estudios VIEW [Heier et al. 2012] pero algo inferior que la objetivada en los estudios prospectivos de estrategia TE conseguimos,

con una media de inyecciones de 7.89 (rango de 6 - 10), una ganancia visual de +10 letras ETDRS en concordancia con los resultados publicados sobre práctica clínica habitual de Rayess y colaboradores [Rayess et al. 2015], donde a pesar de partir de peores visiones iniciales la ganancia llega a ser de +11.6 letras ETDRS.

Con respecto a los cambios anatómicos, nuestros GMCs son intermedios con respecto al resto de estudios analizados y presentamos mejorías significativas a los 3, a los 6 y a los 12 meses, con un descenso final de  $-116.27 \mu$  y un mayor descenso objetivado tras la dosis de carga ( $-88.54 \mu$ ). Al finalizar el estudio, un 10,8% de nuestros pacientes continuaba presentando FIR (n = 1) o LSR (n = 3) y un 27% presentaba DEP seroso (n=1) o fibrovascularizado (n = 9), por lo que si consideramos estos 3 criterios como hallazgos de mácula libre de fluido, nuestra tasa se sitúa en el 62.2%. Si únicamente consideramos como criterios de actividad la presencia de LIR, FIR o DEP serovascularizado (pues se ha visto que en casos crónicos puede persistir cierto componente de DEP fibroso [Schmidt-Erfurth et al. 2016]), nuestro porcentaje de pacientes libre de actividad al finalizar el estudio aumenta hasta el 86.5%. Además, a nivel global se objetiva una restauración en la integridad de las capas externas de la retina (MLE y ZE) con el tratamiento, algo que se ha reflejado en numerosas ocasiones en la literatura con el tratamiento con fármacos antiVEGF [Coscas et al. 2015a; Kim et al. 2012; Oishi et al. 2013; Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Partimos de valores basales de  $1657,45 \pm 233,88 \mu$  de MLE y de  $1730,45 \pm 187,69 \mu$  de ZE, y se observan cambios significativos a los 6 y 12 meses en el primero de los casos hasta alcanzar valores finales de  $1778,7 \pm 172,46 \mu$  de MLE y cambios significativos a los 3, 6 y 12 meses en el caso de la ZE hasta valores de  $1731 \pm 177,68 \mu$  en el momento del final de estudio.

Con respecto al análisis de los cambios producidos en el grosor coroideo, se ha visto que se produce una disminución del mismo tanto en la localización subfoveal como en la zona nasal y temporal a la mácula, siendo estos cambios significativos a los 6 y a los 12 meses del inicio del tratamiento.

Al analizar los resultados de los diferentes patrones objetivados en la retinografía, lo que encontramos es un cambio significativo en cuanto a la presencia de hemorragias (p = 0.004) y de fibrosis (p = 0.012). Las hemorragias se han considerado como signo de exudación activa o de recurrencia de la actividad [Engelbert et al. 2010] por lo que el hecho de que en la visita final sean claramente objetivadas con menor frecuencia puede constituir un signo de que con esta estrategia de tratamiento de TE se consigue disminuir el número de recidivas de la exudación. Con respecto al aumento de la fibrosis, el que este parámetro se encuentre de manera más frecuente al final del seguimiento concuerda con el hecho de que, a medida que el componente

neovascular comienza a ser menos activo con el tratamiento antiVEGF, los neovasos típicamente regresan o se condensan mientras que el componente fibrótico de los mismos aumenta dando lugar a una cicatriz disciforme [Keane et al. 2012]. En la actualidad existe controversia con respecto a si el tratamiento con fármacos antiVEGF puede promover o aumentar el desarrollo de atrofia del EPR propio de la DMAE [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Según nuestros datos, vemos como al finalizar el estudio este parámetro se detecta en un mayor número de ojos (59%,  $n = 19$ ) que al inicio (35%,  $n = 13$ ); no obstante, los cambios no llegan a ser estadísticamente significativos y otros parámetros como la velocidad de crecimiento de áreas de atrofia existentes o el área total de las mismas no han sido valorados, por lo que nuestros datos son escasos para poder responder a esta pregunta. Tampoco se han encontrado cambios significativos con respecto a la presencia de drusas duras o blandas con el tratamiento ni en las diferentes lesiones, en concordancia con los datos de Marsiglia y colaboradores [Marsiglia et al. 2015], si bien es cierto que no se ha realizado una diferenciación del subtipo pseudodrusas reticulares que parece encontrarse con menor frecuencia en las NVC tipo 1 y con mayor frecuencia en las RAP [Marsiglia et al. 2015]. La aparición de exudados es poco frecuente en la DMAE por lo que su escasa incidencia en nuestra serie impide la extrapolación de nuestros resultados. De forma similar a las hemorragias, indican exudación activa y se ha visto que al finalizar el seguimiento su incidencia es menor.

### 5.1.2 Resultados anatómicos y funcionales según el subtipo neovascular

Estudios recientes han observado como las ganancias visuales pueden ser diferentes en función del tipo neovascular [Chae et al. 2015; Daniel et al. 2016; Mrejen et al. 2015] y la respuesta al tratamiento antiVEGF también puede estar influida por el subtipo de membrana neovascular [Freund et al. 2015], por ello, cada vez se considera más importante el realizar una clara identificación de complejo neovascular pues puede conllevar modificaciones pronósticas y terapéuticas.

Una aproximación diagnóstica multimodal con AGF y OCT ha fomentado el desarrollo de la clasificación en subtipos, pero también ha permitido emplear alteraciones anatómicas como elementos diagnósticos y de monitorización [Gallego-Pinazo et al. 2016; Schmidt-Erfurth et al. 2016].

En nuestro estudio hemos subdividido los complejos neovasculares en base a la clasificación propuesta por Freund y colaboradores [Freund et al. 2010] basada en los hallazgos histológicos de Gass [Gass 1994]. Pese a lo limitado del tamaño muestral que, en nuestra opinión, impide la objetivación de cambios significativos en todos los parámetros (excepto en la altura máxima del

DEP) entre las diferentes lesiones, sí se objetiva una tendencia de los mismos que nos permite elucidar hipótesis al respecto (Figura 5.1). A continuación, haremos una pequeña reflexión sobre los diferentes hallazgos en cada uno de los subtipos.

### ***Neovascularización coroidea tipo 1***

Las membranas neovasculares tipo 1 son aquellas que se sitúan por debajo del EPR. Como en nuestros resultados, constituyen el tipo más frecuente de complejo neovascular [Freund et al. 2010; Jung et al. 2014; Marsiglia et al. 2015].

Este tipo de lesiones suelen presentar buenas visiones y comienzan a hacerse sintomáticas con la aparición de exudación [Freund et al. 2010]. Nuestros resultados, en consonancia con lo publicado en la literatura [Mrejen et al. 2015], muestran que este tipo de lesiones presentan la mejor AV inicial con cifras de 0.46 logMAR. Al encontrarse los neovasos entre la membrana de Bruch y el EPR es frecuente la presencia de DEPs [Freund et al. 2010] que suelen constituir la primera manifestación de este tipo de lesiones [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Nuestros datos muestran como al inicio un 75 % de los pacientes de este subgrupo presentaban un DEP seroso ( $n = 6$ ) o fibrovascularizado ( $n = 3$ ) y que va disminuyendo progresivamente con el tratamiento (66.6 % a los 3 meses, 50 % a los 6 meses y 16.6 % a los 12 meses), algo también descrito en la literatura que muestra que típicamente los DEP serosos desaparecen rápida y completamente tras el tratamiento [Nagi el al. 2015] pudiendo persistir una elevación crónica del DEP de tipo fibroso [Schmidt-Erfurth et al. 2016].

La presencia de LSR constituye la forma predominante de exudación en este tipo de lesiones [Freund et al. 2010; Gallego-Pinazo et al. 2016], algo que remarcan nuestros datos, pues en un inicio, el 83.3 % ( $n = 10$ ) de los ojos presentaba LSR frente al 33.3 % ( $n = 3$ ) donde también se objetivaba la presencia de LIR. Además, este LSR suele responder rápidamente a las inyecciones anti-VEGF con las mayores reducciones objetivadas después de 3 inyecciones mensuales [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Nuestros resultados confirman esta rápida reducción, si bien es cierto que, en ciertos pacientes, la presencia de fluido subretiniano puede ser refractaria al tratamiento [Gianniu et al. 2015; Grossniklaus et al. 2004; Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Grossniklaus y Green [Grossniklaus et al. 2004] propusieron que este tipo de lesiones neovasculares pudieran ser una forma compensatoria para proporcionar oxígeno y nutrientes a la retina isquémica y lo relacionaron con una menor incidencia de AG en este tipo de lesiones, algo que corroboraron más adelante otros autores [Marsiglia et al. 2015] reportando un riesgo de

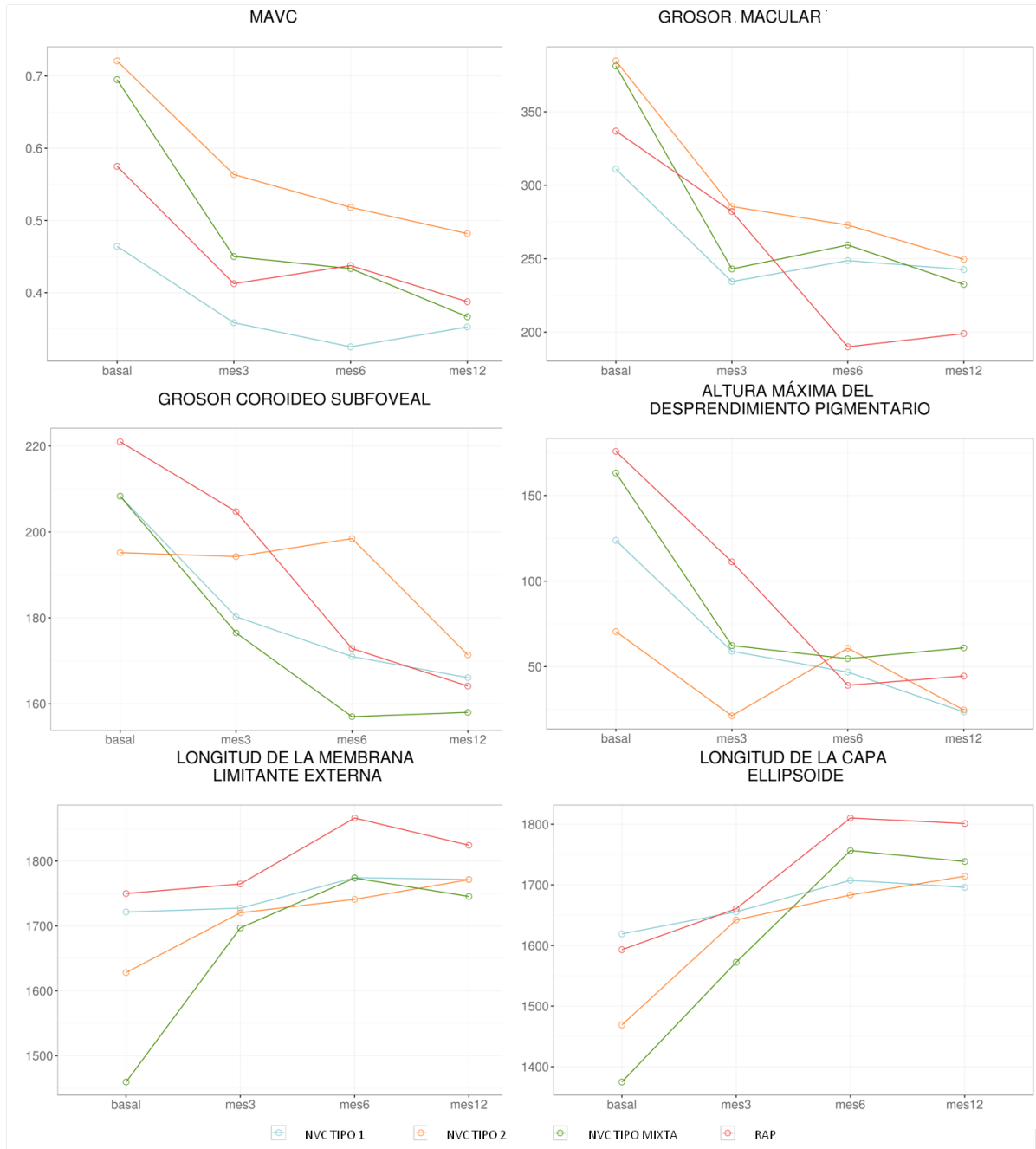


Figura 5.1: Cambios en los principales parámetros según el subtipo neovascular. *NVC*: Neovascularización coroidea; *RAP*: Proliferación angiomasosa retiniana.

hasta 6.7 veces menor de desarrollo de la misma [Xu et al. 2015a]. Nosotros hemos objetivado en nuestros pacientes una tasa de atrofia inicial del 41.6% que, a diferencia de en el resto de subtipos neovasculares donde se objetiva un progreso de la misma, se mantiene estable durante los 12 meses de seguimiento.

Como hemos comentado anteriormente, la principal forma de exudación de este tipo de lesiones es la presencia de líquido por debajo de la retina constituyendo un desprendimiento neurosenso-rial; mientras que la presencia de quistes intrarretinianos, que indican una alteración de la MLE [Freund et al. 2010] son menos frecuentes y aparecen generalmente en fases crónicas de la NVC [Freund et al. 2010; Nagiel et al. 2015; Schmidt-Erfurth et al. 2016]. En consonancia con estos resultados, este tipo de lesiones en nuestro estudio presentan una gran integridad de la MLE (1721  $\mu$ ) y de la ZE (1619  $\mu$ ) que, al igual que en el resto de subtipos neovasculares, se restituyen con el tratamiento.

Con respecto al grosor coroideo, cabe destacar que este subgrupo de nuestros pacientes presenta los mayores grosores coroideos en la localización subfoveal, nasal y temporal, lo que coincide con otros estudios [Hernandez-Martinez et al. 2016; Marsiglia et al. 2015] y parece correlacionarse con la mejor AV presente en este tipo de NVC [Hernandez-Martinez et al. 2016].

### ***Neovascularización coroidea tipo 2***

Los complejos neovasculares tipo 2 son aquellos en que los neovasos han penetrado el EPR / membrana de Bruch y se sitúan por encima del mismo en el espacio subretiniano [Freund et al. 2010]. Este tipo de NVC es menos frecuente en patologías como la DMAE aumentando su incidencia en otras enfermedades de la retina como la miopía patológica o las coriorretinopatías [Freund et al. 2010]. Estudios previos han analizado su incidencia en poblaciones con DMAE estableciendo su valor entre el 13% [Freund et al. 1993] y el 24.6% [George et al. 2010]. En nuestros resultados, hemos objetivado este tipo de lesiones en un 29.7% de los casos, con una incidencia algo superior a la reflejada en los estudios previos.

Con respecto a la AV basal, en nuestros datos, este subgrupo de pacientes presenta la peor AV inicial (0.72 logMAR), valores que mejoran tras la dosis de carga (0.56 logMAR) y que se mantienen con el tratamiento. Sin embargo, al finalizar el estudio, y en concordancia con estudios previos publicados como el de MrejenS y colaboradores [Mrejen et al. 2015], constituyen el tipo de NVC con peor AV final (0.48 logMAR). Esta peor AV basal y la limitada ganancia funcional puede estar relacionada con diferentes factores como veremos a continuación.

En primer lugar, este tipo de NVC, acontecen en nuestra serie en una localización de predominio subfoveal, lo que condiciona una mayor repercusión funcional que las localizadas por fuera de la fóvea. Además, por otro lado, en nuestra serie, constituyen el subgrupo de lesiones con mayor GMC basal y con un VM elevado. Dado que tanto grosos elevados como grosos muy bajos se correlacionan con peores visiones [Jaffe et al. 2013] se ha visto que el GMC ofrece pobres correlaciones con respecto a la AV en la DMAE [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Sin embargo, este signo refleja de forma indirecta, al igual que el VM, el estado de los diferentes compartimentos de la retina. En nuestro caso, este gran grosor macular se acompaña de un aumento del FIR que acontece en un 63 % de los pacientes; y, hasta la fecha, la presencia de FIR constituye el factor predictivo negativo más importante de AV basal y de ganancias visuales [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. De hecho, la presencia de FIR en el momento del diagnóstico de NVC naive se ha asociado con una AV 2 líneas ETDRS inferior a ojos sin FIR [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Estudios cuantitativos han demostrado que hasta el 20 % de la ganancia visual está determinado por el daño irreversible [Jaffe et al. 2013] producido por el FIR sobre las células bipolares [Pelosini et al. 2011] en el momento del diagnóstico y que es independiente de la intensidad del tratamiento antiVEGF administrado [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Así mismo, la presencia de DEP, que se asocia en las NVC naive a una mejor AV basal que los ojos sin DEP [Jaffe et al. 2013; Schmidt-Erfurth et al. 2016] que, probablemente, protege las capas externas de la retina del daño producido por los neovasos, es menos frecuente en este tipo de lesiones [Freund et al. 2010] apareciendo únicamente en el 36.3 % ( $n = 4$ ) de nuestros pacientes. De forma paralela a lo acontecido en las NVC tipo 1, con el tratamiento también se objetiva en los casos con DEP inicial una resolución de los DEPs serosos, persistiendo los DEPs fibrovasculares en las formas crónicas.

Por otro lado, y en relación con lo comentado anteriormente, este tipo de lesiones presentan una mayor desestructuración de las capas externas de la retina [Freund et al. 2010], y como veremos más adelante, tanto la integridad de la MLE como de la ZE constituyen importantes factores predictivos de la AV. En nuestro caso estos pacientes presentan valores iniciales de 1628.18  $\mu$  de MLE y 1468.90  $\mu$  de ZE y, aunque mejoran en gran medida con el tratamiento hasta valores finales de 1771.36  $\mu$  y 1714.27  $\mu$ , respectivamente, la relación no es del todo lineal con la mejoría visual indicando la existencia de otros factores que también intervienen. Uno de estos factores puede ser el desarrollo de atrofia del EPR. La atrofia del EPR aparece principalmente en NVC tipo 2 y tipo 3 [Grunwald et al. 2014; Schmidt-Erfurth et al. 2016; Young et al. 2014]. En un inicio nuestros pacientes presentan un componente de atrofia en el 36 % ( $n=4$ ) de los casos y en la evaluación realizada a los 12 meses este componente lo podemos encontrar en el 63 % ( $n$

= 11) de los mismos. Otro de estos factores puede ser la aparición de material hiperreflectivo subretiniano. Este material hiperreflectivo es mucho más frecuente en las NVC tipo 2 y en las 3 que en las tipo 1 [Schmidt-Erfurth et al. 2016] y se considera como precursor de la fibrosis y cicatrices [Schmidt-Erfurth et al. 2016] y cuya presencia a nivel subfoveal conlleva una reducción de unas 10 letras ETDRS [Bloch et al. 2013] de AV. En nuestra serie, al inicio las NVC tipo 2 presentan un componente fibrótico en el 9% (n = 1) de los casos y al finalizar el seguimiento aparece en el 45% (n = 5) de los casos confirmando la gran tendencia de este tipo de lesiones al desarrollo de cicatrices disciformes.

Otro de los factores que puede condicionar la escasa ganancia funcional es la predisposición de estas lesiones a desarrollarse sobre coroides subfoveales finas [Naysan et al. 2016]. Aunque la implicación del grosor coroideo en cuanto a la cantidad de ganancia visual continúa siendo tema de estudio [Schmidt-Erfurth et al. 2016], publicaciones recientes consideran el tener un menor grosor coroideo en el momento del diagnóstico como un factor predictivo negativo sobre la ganancia visual [Kang et al. 2014b; Kikushima et al. 2016; Shin et al. 2015]. Nuestros pacientes incluidos en el subgrupo de NVC tipo 2 presentan en el momento del diagnóstico los menores grosores coroides a nivel subfoveal y en las 500  $\mu$  nasales y temporales a la fóvea.

### ***Neovascularización coroidea tipo 3 o proliferación angiomasosa retiniana***

Es una entidad en la que el proceso neovascular comienza a nivel intrarretiniano. Los neovasos se originan en las capas internas de la retina y crecen tanto horizontal como verticalmente hasta el espacio subretiniano desde donde pueden continuar su crecimiento o atravesar el EPR y formar una anastomosis retino - coroidea [Yannuzzi et al. 2001]. Su incidencia, inicialmente se estableció en torno al 10 - 15% [Freund et al. 2010] de los procesos neovasculares en la DMAE. No obstante, su mayor conocimiento junto con el progreso de las técnicas de imagen y el análisis multimodal, ha aumentado la cifra [Gallego-Pinazo et al. 2016]) hasta valores del 34.2% [Jung et al. 2014] siendo la incidencia detectada en nuestro estudio del 21.4% de los casos (n = 8). En el RAP es posible detectar diferentes estadios [Yannuzzi et al. 2001]. El estadio I se caracteriza por el crecimiento únicamente a nivel intrarretiniano, siendo típica la visualización de FIR [Schmidt-Erfurth et al. 2016; Yannuzzi et al. 2001], no obstante, dado que este tipo de proceso neovascular no se puede originar dentro de la ZAF su repercusión visual en este punto suele ser menor. Posteriormente, en el estadio II el proceso neovascular llega hasta el espacio subretiniano y como consecuencia produce, la aparición de LSR conformando un desprendimiento neurosensorial, un aumento del FIR y hasta en el 94% un DEP seroso

[Yannuzzi et al. 2001]. Finalmente, en el estadio III, se observa un proceso neovascular coroideo, generalmente en forma de DEP vascularizado, que se comunica con la proliferación intra y subretiniana. Este tipo de lesiones se diagnostican en un 41 % en el estadio I [Yannuzzi et al. 2001], (generalmente durante el seguimiento del ojo enfermo contralateral pues el índice de bilateralidad llega a ser del 100 % en 3 años [Gross et al. 2005]), en el 39 % en el estadio II y en el 20 % de los casos en un estadio III [Yannuzzi et al. 2001]. En nuestra serie hemos encontrado este tipo neovascular en 8 pacientes siendo 5 de ellos (62,5 %) en estadio II (n = 1 en estadio 2 sin DEP y n = 4 en estadio 2 con DEP) y 3 ( 37.5 %) en estadio III. Dado que se inician a nivel intrarretiniano y no aparecen en la ZAF, como hemos comentado, su localización es en todas las ocasiones yuxta o extrafoveal [Yannuzzi et al. 2001]; en nuestra serie encontramos un 62.5 % (n = 5) en la región yuxtafoveal y un 37.5 % (n = 3) en una zona extrafoveal. El hecho de no haber diagnosticado ningún paciente en un estadio I puede estar en relación con el índice de bilateralidad de nuestra serie. Nuestro índice de bilateralidad se sitúa en el 40.5 % lo que indica que la mayoría de pacientes presentaban únicamente un ojo con DMAE exudativa lo que dificulta el diagnóstico de lesiones con poca afectación funcional, como es el caso de los RAP estadio I, pues el paciente todavía suele mantener una buena AV binocular y pueden pasar desapercibidas. Nuestros resultados, sin embargo, no son representativos del gran porcentaje de bilateralidad de este tipo de lesiones pues en los 12 meses que hemos realizado el seguimiento no hemos objetivado la aparición de una NVC tipo RAP en el ojo adelfo siendo esta tasa del 40 % en el primer año en otros estudios publicados [Gross et al. 2005].

Con respecto a los resultados visuales, este tipo de lesiones parten de relativamente buenas AV (0.57 logMAR) y con el tratamiento se observa una mejoría de las mismas, objetivando una mayor ganancia después de los 3 primeros meses de tratamiento, donde se consiguen cifras de 0.41 logMAR que se mantienen prácticamente sin cambios hasta el final (0.38 logMAR). Como hemos comentado, parte de esta buena AV inicial puede ser explicada por su localización extrafoveal [Freund et al. 2010]; además, la ganancia precoz de AV va en consonancia con lo reportado en la literatura donde se describe la rápida y buena respuesta a fármacos antiVEGF de este tipo de lesiones en estadios iniciales [Freund et al. 2010]. No obstante, y como reflejan estudios previos, a medida que se produce la maduración de los neovasos, la respuesta a anti-VEGF es menor y la a ganancia visual final viene limitada sobre todo por las características anatómicas [Freund et al. 2010].

En cuanto a los hallazgos anatómicos encontrados, estos vienen definidos por la secuencia angiogénica de este tipo de lesiones. En ellas, como hemos comentado, el proceso neovascular se

origina a nivel de la retina neurosensorial y es típico encontrar una pérdida de los fotorreceptores que predispone a la comunicación de la circulación intrarretiniana con el EPR subyacente, la membrana de Bruch y la neocirculación a nivel de la coriocapilar [Freund et al. 2010]. Esto se traduce en diferentes elementos anatómicos propios de los diferentes estadios del RAP. El FIR a consecuencia de esta disrupción en las capas externas de la retina y del crecimiento intrarretiniano es el signo de exudación más típico de este tipo de lesiones [Freund et al. 2010; Schmidt-Erfurth et al. 2016; Yannuzzi et al. 2001]. Nosotros encontramos este signo en el momento del diagnóstico en el 75 % (n = 6) de nuestros ojos. La aparición del fluido subretiniano y del DEP acontecen una vez ya nos encontramos en un estadio II o III [Yannuzzi et al. 2001]. En nuestra serie todos los pacientes se encuentran en estos estadios por lo que la incidencia basal de LSR (75 %, n = 6) y de DEP serovascularizado o fibroso (87.5 % n = 7; de los cuales n = 6 DEP seroso y n = 1 DEP fibrovascularizado) concuerda con lo encontrado en la literatura [Yannuzzi et al. 2001]. Al finalizar el seguimiento, estos signos de exudación desaparecen por completo en todos nuestros pacientes indicando que, en nuestro caso, la buena respuesta a antiVEGF todavía se mantiene por lo que deben ser neovasos relativamente inmaduros (a excepción de la tasa de DEP fibrovascularizado que pasa a ser del 50 % (n = 4)). Los cambios en el GMC y en el VM reflejan la coexistencia de todas estas alteraciones retinianas y de la buena respuesta al tratamiento; partimos de GMC y VM elevados y, al desaparecer los signos exudativos, disminuyen siendo las lesiones con valores inferiores de estos dos parámetros al final del seguimiento.

La pérdida de continuidad de la MLE y de la ZE, aunque existe, en nuestros datos resulta menor que en el resto de procesos neovasculares algo que asociamos a su inicio a nivel de la retina neurosensorial y, como hemos comentado, a pesar de constituir estadios II y III los neovasos de nuestros pacientes parecen comportarse de forma inmadura indicando la escasa cronicidad de las lesiones. Además, el hecho de que la medida de la integridad de estas capas se haya realizado sólo en las 2000  $\mu$  centrales subfoveales y que estas lesiones sean por definición, sub o extrafoveales también puede artefactar los resultados de la integridad de dichas capas. Con el tratamiento se consigue, al igual que en el resto de las lesiones, una restauración de su integridad. El desarrollo de atrofia del EPR parece acontecer con mayor frecuencia en este tipo de lesiones [Grunwald et al. 2014; Marsiglia et al. 2015], sin embargo, nuestros resultados no avalan este hecho pudiendo estar artefactados por la limitada muestra de pacientes con RAP evaluados.

Con respecto al grosor coroideo hay estudios que reportan que en estas lesiones es inferior al resto de lesiones neovasculares. Marsiglia y colaboradores [Marsiglia et al. 2015] al evaluar 83 pacientes con DMAE unilateral (39 pacientes con NVC tipo 1, 10 pacientes con NVC tipo 2, 14 con NVC tipo mixta y 20 con RAP) objetivaron que la presencia de un grosor coroideo subfoveal inferior a  $120 \mu$  era más frecuente en los procesos tipo RAP que en el resto de las lesiones. Otros estudios han objetivado grosores coroideos también inferiores a las  $120 \mu$  en las NVC tipo 2. Naysan y colaboradores [Naysan et al. 2016] evaluaron 694 ojos con DMAE exudativa encontrando únicamente en 8 de los mismos una NVC tipo 2 pura y establecieron que en estos pacientes también era frecuente la presencia de coroides subfoveales con un grosor inferior a las  $120 \mu$ . Nuestros datos señalan menores grosores en la NVC tipo 2, ( $195.18 \mu$  a nivel subfoveal) que en las RAP ( $221 \mu$  a nivel subfoveal), pudiendo resaltar la importancia de continuar con estudios con un mayor número de pacientes que analicen los cambios coroideos por subtipos. No obstante, esta divergencia en los valores asociada con la incidencia de NVC tipo 2 del 21.4% en nuestro estudio del 8.3% del estudio de Marsiglia y colaboradores [Marsiglia et al. 2015] y del 0.1% del estudio de Naysan y colaboradores [Naysan et al. 2016] también puede indicar diferencias en cuanto a la clasificación anatómica de los procesos neovasculares, impidiendo la comparación de datos entre estos estudios.

### *Neovascularización coroidea tipo mixto*

Este tipo de lesiones presentan un crecimiento neovascular tanto por encima como por debajo del EPR. Los neovasos de NVC tipo 1 puede penetrar el EPR y dar lugar a lesiones de tipo 2 y está descrita también la involución con el tratamiento precoz de antiVEGF de lesiones tipo 2 hacia NVC tipo 1, con preservación de la MLE, ZE y una buena AV [Naysan et al. 2016]. Además las NVC tipo 3 en su crecimiento intrarretiniano hacia la coroides albergan parte de componente de NVC tipo 1 que se hace más patente una vez se ha establecido la anastomosis retino - coroidea [Freund et al. 2010; Yannuzzi et al. 2001]. Por ello, este tipo de lesiones, al constituir una mezcla de distintos tipos de NVC, van a presentar una gran variedad de signos clínicos. Su incidencia va a depender en gran medida de la sensibilidad y especificidad de las pruebas empleadas para su diagnóstico. En este sentido, se ha visto que el empleo de un análisis de imagen multimodal supone ventajas diagnósticas sobre el uso únicamente de la AGF. La evaluación únicamente con AGF realizada por Jung y colaboradores [Jung et al. 2014] en 2014 sobre 232 ojos estableció la incidencia de este tipo de NVC en el 9.8% de los casos. No obstante, esa incidencia ascendió al 16,9% de los mismos cuando se realizaba un análisis combinado de

AGF + OCT. En nuestro estudio hemos realizado un análisis multimodal y hemos detectado esta entidad en el 16.2% (n=6) de los casos. Sin embargo, pese a coincidir la incidencia con la publicada en la literatura, en nuestro caso constituye el subtipo neovascular con menor número de pacientes incluidos limitando la interpretación de los resultados.

Con respecto a la AV de partida, este tipo de lesiones presenta la segunda peor AV (0.69 log-MAR) la cual mejora con el tratamiento hasta la segunda mejor AV pudiendo indicar, como veremos más adelante, que es posible que un gran porcentaje de este tipo de lesiones presente una mezcla de NVC tipo 1 asociada a otro subtipo. Este tipo de proliferaciones neovasculares presenta un GMC y un VM elevados en su diagnóstico, producidos sobre todo por la coexistencia de LSR y FIR en el 83.3% (n=5) de los pacientes y la presencia de DEP seroso o fibrovascularizado (hallazgo menos frecuente en las NVC tipo 2 y más propio de las NVC tipo 1 y RAP [Schmidt-Erfurth et al. 2016] también en porcentaje similar en el momento del diagnóstico. Estos parámetros desaparecen con el tratamiento y al finalizar el estudio vemos que no se encuentran pacientes con LSR, que únicamente hay dos ojos (33.3%) con FIR y que, únicamente hay un paciente con un DEP seroso y otro paciente con un DEP fibrovascularizado. La presencia del complejo neovascular por encima del EPR, como sucede en las NVC tipo 2, puede ir asociada a una desorganización y desestructuración de las capas de la retina externa [Freund et al. 2010] mientras que la localización del proceso neovascular por debajo del EPR puede promover la integridad de la retina externa [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. No obstante, se ha visto también que a la largo plazo, los ojos con DEP pueden presentar menores ganancias visuales sobre todo si asocian FIR [Schmidt-Erfurth et al. 2015]; hecho atribuible a un daño crónico sobre el complejo Mb de Bruch / EPR / fotorreceptores. En las NVC de tipo mixto el complejo neovascular se sitúa a ambos lados del EPR por lo que el daño sobre las capas externas de la retina puede estar originado tanto por contacto directo entre los neovasos y la ZE como por el daño crónico sobre el EPR que termine afectando a los fotorreceptores. Este es el motivo por el que nosotros pensamos que nuestros pacientes incluidos en este subgrupo presentan las peores integridades de la MLE y de la ZE a nivel basal. No obstante, al igual que en el resto de subtipos se consiguen mejorías con el tratamiento.

Con respecto al desarrollo de atrofia y de fibrosis se observa un aumento de ambas pasando del 66% (n = 4) al 83.3% (n = 5) y del 16% (n = 1) al 33.3% (n = 2), respectivamente. El grosor coroideo medio basal es similar a las NVC tipo 1, no obstante, va a disminuir de forma más llamativa a nivel subfoveal a los 12 meses.

### 5.1.3 Implicaciones pronósticas y terapéuticas de los subtipos neovasculares

Como hemos comentado anteriormente, la estrategia TE constituye una aproximación individualizada al tratamiento de la DMAE. La cronicidad de esta enfermedad y la limitación visual que conlleva hacen que sea fundamental programar la administración de las inyecciones y de las visitas de forma que, mientras se consigue una ganancia visual, se tenga una menor repercusión en la calidad de vida del paciente. El número de inyecciones administradas se ha relacionado en diferentes estudios con mejores ganancias visuales [Mrejen et al. 2015; Rofagha et al. 2013, sin embargo, está aún por esclarecer si el tratamiento antiVEGF frecuente o no promueve el desarrollo de AG. Es por ello importante el intentar identificar marcas anatómicas que nos sirvan como herramientas para la elección del régimen más adecuado de tratamiento y la subclasificación del subtipo neovascular en el momento del diagnóstico puede servir de guía.

En un inicio, el tratamiento antiVEGF se administraba conforme a protocolos fijos por lo que, salvo repercusiones en cuanto al pronóstico, la subdivisión en subtipos neovasculares no conllevaba modificaciones terapéuticas. En 2004 y en 2006, Gragoudas [Gragoudas et al. 2004] y Heier [Heier et al. 2006] como parte de los estudios para comprobar la efectividad de pegabtinib y ranibizumab, respectivamente, evaluaron la ganancia de AV en diferentes tipos de complejos neovasculares subfoveales sin encontrar diferencias entre los mismos. Más adelante, en 2007, Jonas y colaboradores [Jonas et al. 2007] elaboraron un estudio con la finalidad específica de establecer si existían diferencias en cuanto al pronóstico funcional a los 3 meses en los diferentes subtipos de membranas neovasculares tratadas con 1 inyección de bevacizumab. Para ello, evaluaron 67 ojos y los subdividieron según la clasificación del « Macular Photocoagulation Study Group » [Group 1991]. Obtuvieron unas ganancias medias de  $0,4 \pm 2,5$  líneas ETDRS similares en todos los subtipos neovasculares y no objetivaron una correlación entre el tipo neovascular y la ganancia subfoveal corroborando los resultados anteriores con los otros fármacos antiVEGF. De forma similar Tao y colaboradores [Tao et al. 2010], tras subdividir 378 ojos en los diferentes subtipos neovasculares según patrones angiográficos, tampoco encontraron diferencias en la ganancia visual tras administrar 3 inyecciones de bevacizumab en un protocolo fijo bimensual.

Fue con la aparición de los nuevos protocolos de tratamiento donde surgió la idea de que los diferentes subtipos neovasculares pudieran tener un comportamiento diferente y, por lo tanto, podrían beneficiarse más de la aplicación de una determinada estrategia de tratamiento. Por ejemplo, al comparar los pacientes incluidos en el estudio MARINA [Rosenfeld et al. 2006] y

ANCHOR [Brown et al. 2006] se vio que los pacientes con membranas tipo 1 presentaban una mejor AV basal que las NVC tipo 2 y, sin embargo, conseguían menores ganancias visuales. Esta menor ganancia funcional se atribuyó a un efecto negativo del tratamiento fijo mensual en este tipo de NVC, pues un tratamiento intensivo con la eliminación del LSR podría disminuir el aporte compensador de nutrientes a la retina que se atribuye al LSR en este tipo de NVC y fomentar el desarrollo de AG [Engelbert et al. 2010]. Por el contrario, regímenes más laxos como el valorado en el estudio PIER [Regillo et al. 2008] donde tras una dosis de carga de 3 inyecciones se pasaba a una administración fija trimestral presentaba menores ganancias visuales y un mayor número de hemorragias maculares [Barbazetto et al. 2010; Engelbert et al. 2010].

En un primer momento se comenzó por valorar estas nuevas estrategias de tratamiento en los subtipos neovasculares que consideraban con un curso natural diferente para ver si se conseguía la misma efectividad que con los regímenes fijos mensuales. En 2010, Engelbert y col [Engelbert et al. 2010], valoraron la eficacia de un régimen TE con bevacizumab o ranibizumab en NVC tipo 1 y en RAP. Las lesiones NVC tipo 1 clásicamente se han asociado con una mayor estabilidad en su curso y un mejor pronóstico visual [Engelbert et al. 2010; Freund et al. 2010]. Por el contrario, las lesiones tipo RAP se relacionan con un curso más agresivo con exudación y hemorragias recurrentes y con mayor riesgo de bilateralización que el resto de complejos neovasculares [Engelbert et al. 2009]. En relación con las NVC tipo 1, tras aplicar un protocolo TE levemente modificado (con un periodo máximo de extensión a 10 semanas, y considerando como libre de fluido máculas con DEP y con LSR que no afectase al perfil foveal), consiguieron con 12 inyecciones y 12 visitas en 24 meses : a) ganancias visuales en los primeros meses y, posteriormente, una estabilización de la AV a 24 y 36 meses con cambios visuales de 0.53 logMAR basal a 0.52 logMAR a 24 meses, b) una baja tasa (6 %) de desarrollo de AG que relacionaron con sus laxos criterios de retratamiento que permitía el aporte de nutrientes compensador de LSR y c) la ausencia de nuevas hemorragias maculares que asociaron a la administración frecuente de tratamiento intravítreo. Con respecto a los complejos tipo RAP este grupo mediante el empleo de un protocolo de TE con un máximo de extensión a 10 semanas y una media de 7 inyecciones el primer año, 6 inyecciones el segundo año y 7 inyecciones el tercer año consigue ganancias visuales máximas en los 3 primeros meses (pasando de 20/80 Snellen (0.6 logMAR) a 20/30 Snellen (0.2 logMAR)) y que se mantienen estables a 36 meses de seguimiento.

Una vez confirmada la aparente efectividad de este régimen en los diferentes tipos neovasculares, a falta de ensayos clínicos randomizados prospectivos, se desarrollaron estudios retrospectivos

con todos los subtipos neovasculares que intentan dar respuesta a si existen o no diferencias en cuanto al número de inyecciones y visitas requeridas y la ganancia visual con esta estrategia proactiva. Uno de los estudios con mayor tiempo de seguimiento es el publicado por Mrejen S y colaboradores [Mrejen et al. 2015]. Hemos comentado anteriormente cómo este estudio evalúa la efectividad del régimen TE en la práctica clínica diaria con resultados funcionales similares a los regímenes fijos mensuales. Sin embargo, también realiza un subanálisis de los resultados obtenidos según los diferentes tipos neovasculares. En primer lugar, analiza la repercusión del empleo de la clasificación angiográfica frente a la clasificación multimodal de los subtipos neovasculares concluyendo que el uso de la clasificación mediante AGF + OCT ofrecía menor variabilidad interobservador y una mayor correlación con los resultados funcionales. Además, analiza el número de inyecciones y de visitas requeridas en cada uno de los subtipos. El número medio de inyecciones por año fue de 8.8, 7.7, 7.8 y 8.1, respectivamente para las lesiones tipo 1, 2, mixtas y RAP, por lo que las NVC tipo 1 recibían un mayor número de inyecciones que el resto de subtipos; presumiblemente por la mayor refractariedad de los signos exudativos. Con respecto a los resultados funcionales, obtuvieron que las NVC tipo 1 partían de las mejores AV basales, seguidas de las RAP, las NVC tipo 2 y las NVC tipo mixto y que esta misma secuencia se mantenía igual en los análisis realizados en los años 1, 2, 3 y 4. Las NVC tipo 1 constituían el único subtipo en que se conseguía una ganancia visual que se mantenía al finalizar el seguimiento. En el resto de lesiones se hallaba una ganancia inicial seguida de un deterioro visual progresivo a partir de los 18 meses. Por 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 con este régimen de tratamiento. Esto puede ser por dos motivos: por un lado porque las NVC tipo 1 constituyen efectivamente un mecanismo protector de la retina isquémica con menor desarrollo de AG y que al presentar vasos más maduros con un menor potencial de crecimiento el deterioro retiniano a largo plazo sea menor independientemente del régimen de tratamiento utilizado y, por otro lado, porque aún usando una estrategia individualizada como es el TE en el resto de lesiones no se consiga impedir el desarrollo de fibrosis subretiniana que acontece en las NVC tipo 2 y mixtas y de AG que aparece en las RAP y que finalmente produce un deterioro visual [Rofagha et al. 2013].

Un subanálisis del estudio CATT [Daniel et al. 2016] realizó también una diferenciación en subtipos, reportando los resultados obtenidos con los RAP en regímenes mensuales fijos y PRN. En este subanálisis se realizaron dos subgrupos, por un lado los RAP diagnosticados según criterios únicamente angiográficos y, por otro lado el resto de subtipos NVC. Los resultados mostraron que en el primer año las lesiones tipo RAP, a pesar de recibir un menor número de

inyecciones que el resto de lesiones en el grupo PRN, presentaban mayores ganancias visuales (10.6 vs 6.9 letras ETDRS) y mayor reducción del GMC y de los signos exudativos. Podríamos pensar que existen diferencias significativas con lo reportado por Mrejen y colaboradores [Mrejen et al. 2015], donde las mejores visiones en el primer año se consiguen en el subgrupo de NVC tipo 1. No obstante, tenemos que tener en cuenta que en este estudio es posible que al englobar las NVC tipo 1 con el resto de lesiones NVC de como resultado final una media de AV inferior a las RAP. Por otro lado, el que encuentre significativo el que los RAP han recibido un menor número de inyecciones que el resto de subtipos en los pacientes PRN también puede explicarse porque, como ya hemos comentado, los RAP responden rápidamente a los antiVEGF sobre todo en los estadios iniciales [Freund et al. 2010] mientras que otros tipos de membranas, como las tipo 1, pueden presentar signos exudativos refractarios [Freund et al. 2010]. Los resultados a 2 años muestran como finalmente el deterioro visual del subtipo RAP se iguala al resto de procesos neovasculares por lo que parece confirmar que puede ser que ningún régimen de tratamiento (ni el TE [Mrejen et al. 2015] ni el mensual fijo o el PRN [Daniel et al. 2016]) permita mantener la visión a largo plazo en este tipo de lesiones. No obstante, como las NVC tipo RAP suelen acontecer en pacientes más añosos [Daniel et al. 2016; Engelbert et al. 2009] y, por lo tanto, con menor esperanza de vida, el tratamiento de esta patología resulta crucial para una mejor calidad de vida.

Nuestros resultados presentan una AV basal en las NVC tipo 1, seguida de las RAP, las NVC tipo mixta y, finalmente las NVC tipo 2. Al finalizar el estudio el orden de mayor a menor AV sería NVC tipo 1, NVC tipo mixta, RAP y NVC tipo 2. Como podemos ver nuestros datos, en cuanto a los subgrupos con mejores AV basales, son similares a los publicados con Mrejen y colaboradores [Mrejen et al. 2015]. Las diferencias en el orden entre las NVC tipo mixta y las NVC tipo 2 pueden ser porque los pacientes incluidos en el subgrupo de NVC tipo mixta pueden presentar características neovasculares diferentes en ambos estudios. Como hemos visto este tipo de lesiones conlleva la presencia de más de un subtipo NVC por lo que, si en nuestros pacientes predominan los que presentan NVC tipo 1 asociada a otro subtipo, esto podría justificar tanto la mejor AV basal como la mejor AV final. A diferencia del estudio de Mrejen y colaboradores [Mrejen et al. 2015] y de Daniel y colaboradores [Daniel et al. 2016], nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en los diferentes subgrupos en cuanto a la ganancia visual final ni en cuanto al número de inyecciones. Esto puede ser debido a varios motivos: por un lado puede estar condicionado por nuestro limitado tamaño muestral y de seguimiento, pues, como hemos comentado, en los primeros 12 meses todos los grupos presentan ganancias visuales y es a partir de los 18 meses cuando comienza el deterioro en

todos los subgrupos salvo en las NVC tipo 1 [Mrejen et al. 2015]. Por otro lado, nuestro número medio de inyecciones por subgrupo es 7.66 en las NVC tipo 1 y en las NVC tipo mixta, 8.63 en las NVC tipo 2 y 7.37 en las NVC tipo RAP. En concordancia con lo publicado por Daniel y colaboradores [Daniel et al. 2016] pese a usar un régimen diferente nosotros también hemos objetivado un menor número de inyecciones en el subtipo RAP en el primer año y, es posible que nuestro menor número de inyecciones en el subtipo de NVC tipo 1 sea debido a que hemos sido menos agresivos con la presencia de leves cuñas de LSR que no afecten al perfil foveal de forma similar a Engelbert y colaboradores [Engelbert et al. 2010], pues se ha visto que la presencia de LSR condiciona un buen pronóstico visual que no se ve influido por un infratratamiento [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Así mismo, el que hayamos tratado más frecuentemente a las NVC tipo 2 puede estar justificado porque en el momento diagnóstico eran el tipo de lesiones con mayores factores predictivos negativos de ganancia visual.

#### 5.1.4 Factores pronósticos de agudeza visual

A lo largo de este texto, hemos ido comentando la existencia de factores pronósticos o predictivos de la AV. La identificación de factores predictivos de buenas o malas visiones en el momento del diagnóstico va a permitir pronosticar la respuesta al tratamiento con antiVEGF. Estos factores pueden ser tanto alteraciones anatómicas o funcionales como la presencia de comorbilidades o tratamientos concomitantes que puedan tener influencia en la AV. Algunos estudios han mostrado una correlación negativa entre la edad inicial [Mrejen et al. 2015], la HTA [Mrejen et al. 2015], la toma de aspirina [Mrejen et al. 2015] y de clopidogrel [Chae et al. 2015; Mrejen et al. 2015] con la AV final.

Con respecto a los factores funcionales los datos son controvertidos y vienen influidos sobre todo por las alteraciones anatómicas coexistentes [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Existe por ello controversia en si es más predictiva de la visión final la AV basal [Boyer et al. 2007; Kaiser et al. 2007; Singer et al. 2012] o la AV tras las 3 inyecciones de la dosis de carga [Chae et al. 2015; Rasmussen et al. 2013]. En líneas generales, se ha encontrado una correlación entre la AV basal y la AV final por la cual se obtienen menores ganancias en pacientes con mayores AV al inicio motivado por un efecto techo de la AV, pero al finalizar el tratamiento una mejor AV basal condiciona una mayor AV final [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Nosotros hemos observado una correlación entre la AV en todos los puntos analizados del estudio con la AV final, sin cambios estadísticamente significativos entre ninguno de ellos; de forma que, según nuestros datos, podemos concluir que mejores AV se relacionan con mejores AV tras el tratamiento.

En relación con los factores anatómicos, diferentes estudios parecen coincidir en que la presencia de NVC tipo 1 en el momento del diagnóstico [Chae et al. 2015; Mrejen et al. 2015], constituye un factor predictivo positivo de buena visión final pero faltan datos al respecto [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. La presencia de FIR constituye hasta la fecha el mayor factor pronóstico negativo [Schmidt-Erfurth et al. 2016] mientras que en el caso del LSR existe una correlación positiva entre su presencia y una mejor AV final [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. En nuestro estudio hemos analizado la posible influencia del GMC, VM, altura del DEP, longitud de la MLE y de la ZE y grosor coroidal, obteniendo que existe una correlación positiva estadísticamente significativa con la AV en logMAR entre el GMC, la altura máxima del DEP y su altura a 500  $\mu$  nasales y temporales; y una correlación negativa significativa entre la longitud de la MLE y la ZE con la AV final logMAR. Diferentes estudios han analizado el valor del GMC como factor predictivo llegando a la conclusión que GMC por encima o por debajo de la media condicionan peores visiones [Jaffe et al. 2013; Schmidt-Erfurth et al. 2016]. En nuestro estudio, el GMC elevado se relaciona con la presencia de alteraciones en las capas internas de la retina reflejo de actividad exudativa. La presencia de DEP y su implicación pronóstica constituye uno de los hallazgos más en auge en la actualidad [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Como hemos comentado con anterioridad, este hallazgo es típico de NVC tipo 1 y de RAP y, al mantener el proceso neovascular lejos de las capas externas de la retina, puede conllevar una menor afectación visual [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. De hecho, clásicamente se pensaba que la presencia de DEP se asociaba a mejores AV finales [Jaffe et al. 2013] pero estudios posteriores ha demostrado una AV final similar a ojos sin DEP en el momento del diagnóstico [Schmidt-Erfurth et al. 2015] y una mayor pérdida visual en regímenes individualizados que no consideran este factor como signo de actividad habiendo controversia en la actualidad sobre su influencia. Nuestro estudio ha analizado si la altura del DEP tenía repercusiones o no sobre la AV final y los resultados parecen establecer que DEPs iniciales más altos conllevan peores AV finales. Puede llamar la atención el hecho de que la altura del DEP subfoveal no haya salido relevante como factor pronóstico visual, hecho que nosotros asociamos a que, en general, los cambios intrarretinianos asociados a los DEP suelen aparecer a los lados del mismo, por lo que DEPs nasales o temporales a la fovea pueden producir mayores alteraciones anatómicas retinianas subfoveales (FIR, LSR) que DEPs propiamente subfoveales.

La influencia de la integridad de las capas externas de la retina en la visión ha sido un tema ampliamente estudiado, pero continua presentando resultados contradictorios en los diferentes estudios; hecho que se atribuye principalmente a su dificultad en la medida. Oishi y colaboradores [Oishi et al. 2010] mostraron que el estado de la MLE se correlacionaba de manera más

fuerte con la AV que la capa de los fotorreceptores. De forma similar, Coscas y colaboradores [Coscas et al. 2015a] establecieron que, aunque tanto la MLE como la ZE se relacionaban con la AV, únicamente la MLE podía ser considerada como factor predictivo de la AV final. En contraposición, otros autores [Kim et al. 2012; Mathew et al. 2013] consideraron que el estado de las capas externas de la retina no permitía predecir la AV final. Nuestros resultados señalan que tanto la integridad de la MLE como de la ZE se correlacionan de forma débil con una mejor AV final y que, además, ambas capas se restituyen con el tratamiento promoviendo el desarrollo de estudios clínicos randomizados con mayor número de pacientes que nos aporten datos más esclarecedores al respecto.

A diferencia de otros estudios en que un menor grosor coroideo se ha relacionado con peores AV [Shin et al. 2015], nosotros no hemos encontrado relación entre el grosor de la coroides y la ganancia visual; si bien es cierto que hemos encontrado que se producen cambios en la capa uveal durante el estudio.

#### 5.1.5 Grosor coroideo

Las nuevas OCTs nos están permitiendo conocer el comportamiento de la coroides en diferentes enfermedades de la retina, entre ellas, en la DMAE [Mrejen et al. 2013]. No obstante, para realizar una correcta interpretación de los datos debemos tener en cuenta tanto la variabilidad en la medida del espesor coroideo que normalmente se hace de forma manual [Mrejen et al. 2013] (con la ayuda de un caliper digital que mide la longitud de una línea entre la parte externa de la línea hiperreflectiva del EPR y la interfaz corio - escleral) como la gran influencia que presentan determinados factores sobre esta capa vascular [Mrejen et al. 2013]. Entre estos factores encontramos que el grosor coroideo en ojos sanos ha demostrado tener una correlación negativa con la edad [Tan et al. 2016c; Ikuno et al. 2009], la longitud axial [Esmaelpour et al. 2010] y positiva con el error refractivo [Ikuno et al. 2009; Ikuno et al. 2010] y el sexo masculino [Tan et al. 2016c; Wei et al. 2013]. También se ha visto que en condiciones normales, se produce una variación diurna del grosor coroideo [Tan et al. 2016c] y que comorbilidades tanto oculares (glaucoma [Arora et al. 2012]) como sistémicas (diabetes mellitus [Tan et al. 2016c], enfermedad cardiovascular [Akçay et al. 2016]) también pueden producir cambios en su medida al ser una capa vascular.

Con respecto a su papel en la DMAE los datos son contradictorios. Hay estudios que señalan que esta capa está más adelgazada en la DMAE precoz que en ojos sanos, hecho que explicaría la hipoperfusión coroidea como uno de los sustratos anatómicos de esta patología [Chirco et al.

2016; Esmaeelpour et al. 2014]. Sin embargo, muchos de estos estudios no han tenido en cuenta la influencia que la edad o la longitud axial pudieran tener a la hora de llevar a cabo sus medidas y, al realizar esta corrección, el grosor coroideo en pacientes con DMAE parece estar dentro del rango de la normalidad [Schmidt-Erfurth et al. 2016]. Otros estudios han relacionado el grosor coroideo con la posible ganancia visual. Shin y colaboradores [Shin et al. 2015] encontraron que coroides más finas limitaban la ganancia visual en ojos con DMAE y VCP tratados con ranibizumab a 12 meses; y encontramos un mayor grosor coroideo en las NVC tipo 1 [Marsiglia et al. 2015] que, como ya hemos comentado, parecen presentar el mejor pronóstico funcional [Mrejen et al. 2015] y en las que recientes estudios han relacionado mayores grosores coroides con mayores ganancias visuales [Hernandez-Martinez et al. 2016]. No obstante, en contraposición, Koizumi y colaboradores [Koizumi et al. 2016a] únicamente hallaron relación entre la ganancia visual y el grosor coroideo en el caso de las VCP no así en el resto de subtipos neovasculares propios de la DMAE.

Es también tema de controversia las variaciones en el grosor coroideo que se producen tras el tratamiento de la DMAE. Se ha visto que el tratamiento de esta patología con terapia fotodinámica produce un engrosamiento inicial, que es seguido de un descenso progresivo durante 6 meses [Maruko et al. 2011] con reducciones entre el 17.4 y el 13.1 % del grosor coroideo, datos muy superiores a los  $4 \mu$  / anuales esperables por el envejecimiento [Wei et al. 2013]. Con respecto a los antiVEGF el estudio de Yamazaki y colaboradores elaborado en el 2012 [Yamazaki et al. 2012] objetivó un descenso significativo del mismo (reducción del 7,4 % a los 3 meses) en ojos tratados con ranibizumab PRN durante 12 meses; no obstante otros grupos no encontraron cambios significativos [Ellabban et al. 2012; McDonnell et al. 2014] con esta medicación. Recientes estudios han valorado el efecto de aflibercept en esta variable dado que su diferente mecanismo de acción parece proporcionarle un mayor efecto sobre la vasculatura coroidea que ranibizumab [Koizumi et al. 2016a]. Koizumi y colaboradores [Koizumi et al. 2016a] tras analizar 144 ojos tratados con aflibercept (3 inyecciones de dosis de carga e inyecciones bimensuales fijas) durante 12 meses demostraron un descenso global de  $35.7 \mu$  del grosor coroideo (tasa del 13.2 %) pasando de las  $268.1 \mu$  basales a las  $233.0 \mu$  a los 3 meses y a las  $232.4 \mu$  a los 12 meses, siendo llamativa esta disminución no sólo en el cuadrante subfoveal sino en la totalidad del área macular indicando que aflibercept puede tener efecto no sólo en el componente neovascular sino a nivel coroideo de todo el área macular. Estudios con estrategia TE como el publicado por Ohnaka y colaboradores [Ohnaka et al. 2016] también han hallado una disminución del grosor coroideo subfoveal a 12 meses.

Nuestros resultados muestran un descenso del grosor coroideo significativo a los 6 y a los 12 meses de tratamiento en todo el área macular pasando de valores iniciales de 207.16  $\mu$  a finales de 165.91  $\mu$  a nivel subfoveal con un descenso global de 42  $\mu$  (reducción de 19.9%) algo superior a los estudios publicados con aflibercept [Koizumi et al. 2016a] y en consonancia con los resultados producidos con la terapia fotodinámica [Maruko et al. 2011]. Aunque el número de inyecciones administradas podría justificar estos cambios en la reducción del grosor coroideo con aflibercept, tanto en nuestro estudio como en el publicado por Koizumi y colaboradores [Koizumi et al. 2016a], la media de inyecciones es similar siendo de 7.66 vs 7.2 a 12 meses. Por ello, consideramos que esta reducción ligeramente superior en nuestro estudio puede ser debida a una mayor eficacia de aflibercept (ya sea por las características basales de los pacientes o por el régimen de tratamiento empleado) en nuestros pacientes. Estudios recientes han demostrado que se produce una menor disminución del grosor coroideo en ojos con actividad exudativa persistente [Koizumi et al. 2016a] que en ojos libres de fluido. En nuestro caso, el tratamiento con aflibercept resulta altamente eficaz en la mayoría de los ojos, con porcentajes de mácula libre de fluido del 62.2% al final del tratamiento mientras que en el estudio de Koizumi y colaboradores [Koizumi et al. 2016a], aunque sí se objetiva la resolución de la exudación en el 77% de los ojos tras la dosis de carga, al finalizar el estudio únicamente un 38% presentan una mácula seca.

## 5.2 Estudio experimental

### 5.2.1 Análisis cuantitativo de exosomas circulantes en plasma

Los exosomas son pequeñas vesículas extracelulares de entre 30 - 100 nm cuyo origen intracelular consta de 3 etapas [Iraci et al. 2016]. En primer lugar, se forman vesículas de invaginación de la membrana plasmática celular. En un segundo tiempo, estas vesículas se invaginan creando los cuerpos multivesiculares. En una tercera etapa, estos cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática, liberando al medio sus vesículas intraluminales que son los exosomas. Estas microvesículas son producidas por numerosos tipos celulares [Ha et al. 2016] y se encuentran en distintos fluidos corporales tales como. Su estructura es en forma de bicapa lipídica presentando en su interior un contenido de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que va a ser diferente en función de la célula de origen [Ha et al. 2016] y que parece ser crucial para su función biológica [Ha et al. 2016].

Los exosomas pueden ser aislados mediante diferentes técnicas y en distintos fluidos corporales como en la orina o plasma [Lawson et al. 2016; Vlassov et al. 2012] donde sus concentraciones llegan a 3.000.000 por microlitro [Zwicker et al. 2009]. Uno de los métodos más frecuentemente empleado es la ultracentrifugación diferencial a partir de muestras plasmáticas en donde se aíslan los exosomas de grandes partículas y debris celular en base a su pequeño tamaño [Vlassov et al. 2012]. Se han descrito diferentes protocolos de ultracentrifugación que presentan variaciones en parámetros como la velocidad, el tiempo y la temperatura a la que se llevan a cabo las diferentes centrifugaciones [Biasutto et al. 2013; Hoffman et al. 2009; Stamer et al. 2011]. También, la resuspensión del pellet puede ser llevada a cabo con PBS enriquecido con Calcio y Magnesio [Locke et al. 2014], FBS [Biasutto et al. 2013] o con TBS como en nuestro caso. Otra forma muy empleada para su caracterización es el estudio de su composición proteica. Como los exosomas surgen a partir de los cuerpos multivesiculares, independientemente de las proteínas diferenciales de cada célula de origen, todos ellos van a presentar en su membrana plasmática diferentes proteínas que intervienen en los fenómenos de fusión celular tales como las proteínas de calor (Hsp70 y Hsp90), las integrinas o las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82) [Hackett et al. 2000; Vlassov et al. 2012].

Nuestros resultados muestran que nuestro protocolo empleado para el aislamiento y la detección exosómica es un protocolo eficaz, pues hemos detectado la presencia de estas vesículas en las muestras plasmáticas de nuestros pacientes. Mediante un protocolo de ultracentrifugación diferencial de muestras no congeladas, hemos conseguido aislar exosomas en todas las muestras analizadas. No obstante, los protocolos de centrifugación pueden dar lugar a un pellet donde, además de exosomas, se encuentren otras vesículas de gran tamaño o agregados proteicos [Ha et al. 2016]. Para minimizar este posible artefacto y con el objetivo de cuantificar los exosomas aislados, nosotros hemos completado el protocolo de centrifugación con un estudio de citometría de flujo basado en el marcaje exosómico con anticuerpos anti - CD9, una de las tetraspaninas frecuentemente hallada en estas vesículas. Como resultado, hemos encontrado que en pacientes controles o sanos, los niveles en plasma de exosomas presentaban unos valores medios de 1510000 / mL, mientras que en pacientes casos o con DMAE estos niveles ascendían a 2000000 / mL.

Inicialmente los exosomas se consideraron como proteínas que, tras ser expulsados por los reticulocitos, intervenían en el proceso madurativo de los eritrocitos [Johnstone 2005]. Posteriormente, se les atribuyó un papel en la eliminación de residuos celulares. No obstante, a medida que se ha ido profundizando en el conocimiento de estas microvesículas, se les han ido atribuyendo numerosas funciones esenciales para un correcto funcionamiento del organismo,

siendo igual o más numerosas que los tipos celulares que las producen. Su funcionalidad va a depender en gran medida de la célula de origen, aunque también puede ser regulada por estímulos extrínsecos, por lo que se piensa que diferentes mecanismos de comunicación celular puedan conferirles funciones hasta la fecha desconocidas [Iraci et al. 2016].

Dentro de las funciones más conocidas destaca su papel como mecanismo de comunicación intercelular la cual puede llevarse a cabo de forma yuxtacrina, por fusión con la célula diana, mediante la activación de receptores por ligandos extracelulares o por fagocitosis [Ha et al. 2016]. Esta amplia variedad de transmitir una señal les va a permitir actuar tanto en células vecinas como en células a distancia pudiendo modular la producción y liberación exosómica y la composición de los mismos. Otras funciones que se les han atribuido son en el control del sistema inmune (como modulador del complemento [Thery et al. 2009], como células presentadoras de antígenos [Thery et al. 2002]), en la cascada de la coagulación, de la inflamación y de la angiogénesis [Janowska-Wieczorek et al. 2005], o como mecanismo de propagación de virus [Pegtel et al. 2011] o priones [Leblanc et al. 2006].

Además de en procesos biológicos normales, los exosomas se han relacionado con diferentes enfermedades. Desde el punto de vista oftalmológico, destaca su asociación con el glaucoma [Hardy et al. 2005; Hoffman et al. 2009; Stamer et al. 2011] o la DMAE [Atienzar-Aroca et al. 2016; Kannan et al. 2016; Khan et al. 2016]. Nuestros resultados indican un mayor número de estas microvesículas en el plasma de pacientes casos, no obstante, estos podrían haber sido producidos en diferentes tipos celulares y no tendrían por qué estar relacionadas con la DMAE. Para confirmar la procedencia ocular de los exosomas circulantes de nuestros pacientes, procedimos al estudio de la presencia en los mismos de una proteína específica del EPR, la RPE65.

RPE65 o retinoide - isómero - hidrolasa es una proteína del EPR de 65 kDa de peso molecular fundamental para el proceso de fototransducción [Kiser et al. 2010]. Esta enzima es la encargada de la conversión del todo - trans retinal en su forma 11- cis permitiendo la regeneración del ciclo visual y es crítica para la salud de los fotorreceptores [Kiser et al. 2010]. Se encuentra en su mayoría asociada a la membrana del retículo endoplásmico liso de las células del EPR; siendo este orgánulo muy abundante debido al elevado metabolismo lipídico de los retinoides. Tras el marcaje de nuestros exosomas con anticuerpos anti - RPE65 pudimos comprobar por citometría de flujo cuántos de los exosomas aislados tenían un origen ocular. El análisis de la cantidad de exosomas RPE65 con respecto del total de exosomas en plasma muestra una mayor

cantidad de estas vesículas en pacientes con DMAE exudativa con respecto a los controles sanos ( $p = 0.005574114$ ).

Estos resultados, aunque novedosos, concuerdan con lo conocido hasta la fecha sobre la patogenia de la DMAE. El envejecimiento y el estrés oxidativo producen una disfunción metabólica en las células del EPR y un estado inflamatorio crónico que, mantenido en el tiempo, conlleva el daño en el EPR y en los fotorreceptores que se produce en esta enfermedad [Lambert et al. 2016]. Nuestro grupo ha mostrado como *in vitro* células del EPR ARPE-19, sometidas a un estrés oxidativo aumentan la producción y liberación de exosomas [Atienzar-Aroca et al. 2016]. Por este motivo no es de extrañar que pacientes con DMAE presenten en plasma un mayor número de estas microvesículas que pacientes sanos. Aunque el contenido exacto de estos exosomas y su funcionalidad todavía se desconocen, nosotros comprobamos que el estrés oxidativo aumentado no sólo incrementa el número de exosomas producidos sino que también aumenta la cantidad de VEGFR1 y VEGFR2 que estas vesículas presentan en su membrana y la cantidad de mRNA para sintetizar VEGFR1 y VEGFR2 [Atienzar-Aroca et al. 2016]; lo que resalta la importante función de comunicación celular que llevan a cabo estas vesículas y la modulación del contenido exosómico en respuesta a estímulos extrínsecos. Otros grupos también han estudiado el papel de los exosomas en la patogenia de la DMAE y la respuesta exosómica ante situaciones de estrés oxidativo. Wang y colaboradores [Wang et al. 2009] proponen la idea de lo que los exosomas participan en la formación de drusas al incrementar la liberación de proteínas intracelulares del EPR. Kannan y colaboradores [Kannan et al. 2016] comparten esta idea y destacan, en concreto, el papel de la alpha A y alpha B cristalinas en el desarrollo de la enfermedad, atribuyéndoles a estas proteínas un papel protector y modulador de la angiogénesis. Biasutto y colaboradores [Biasutto et al. 2013] atribuyen la presencia de proteínas fosforiladas en el humor vítreo en respuesta al estrés oxidativo de células de EPR a los exosomas; y el grupo de Ebrahimi [Ebrahimi et al. 2014] ha corroborado como lipoproteínas de baja densidad oxidadas similares a las encontradas en la membrana de Bruch de pacientes con DMAE favorecen la eliminación exosómica del EPR de factores reguladores del complemento (CD46 y CD59). Todos estos estudios aportan consistencia a nuestros resultados, pues refuerzan la base científica de que los exosomas constituyen vesículas clave en el desarrollo de la DMAE, y como muestra nuestro experimento, se encuentran en mayor cantidad en el plasma de pacientes enfermos.

Es importante destacar que en nuestro estudio se han valorado muestras plasmáticas de pacientes sanos sin ninguna enfermedad retiniana objetivable frente a pacientes con un estadio

de DMAE avanzada, lo que podría favorecer la diferencia numérica encontrada. Además, en concreto, los pacientes con DMAE avanzada presentaban la forma exudativa o neovascular de la enfermedad y numerosas investigaciones han mostrado la relación entre los exosomas y la angiogénesis. Por ejemplo, células de glioblastoma liberan exosomas con mRNA, miARN y proteínas angiogénicas que cuando son internalizados por las células endoteliales de los vasos cerebrales estimulan la formación de estructuras tubulares neovasculares [Skog et al. 2008]; y exosomas plaquetarios en el cáncer de pulmón estimulan la expresión de mRNA para factores angiogénicos como la MMP-0, el VEGF o la interleukina-8 [Janowska-Wieczorek et al. 2005]. A nivel oftalmológico, los exosomas han mostrado presentar diferentes efectos en función de la célula de origen. Así, exosomas provenientes de astrocitos retinianos presentan un efecto antiangiogénico inhibiendo el desarrollo de neovasos y reduciendo la fuga capilar en un modelo de neovascularización experimental inducida con láser. Por el contrario, el cocultivo de células de linfoma de burkitt infectadas con EBV con células del EPR ARPE - 19 favorece la transmisión exosómica de miR - 155 e incrementa el VEGF funcional en dichas células [Kong et al. 2014]. Como hemos comentado con anterioridad, nuestro grupo vio que ante el estrés oxidativo las células del EPR producían mayor cantidad de exosomas con mayores niveles de VEGFR1 y VEGFR2 en su membrana y mayor cantidad de mRNAs para sintetizar dichos receptores [Atienzar-Aroca et al. 2016]. Además, observamos que cuando interactuaban estos exosomas procedentes de células del EPR estresadas con células endoteliales de cordón umbilical humano se producía un aumento de la angiogénesis, mientras que si la interacción se hacía con exosomas de células del EPR no sometidas al estrés oxidativo se inhibía la formación tubular neovascular [Atienzar-Aroca et al. 2016]. El VEGF es el principal factor promovedor de la angiogénesis en pacientes con DMAE exudativa [Campochiaro 2015] por lo que nuestros resultados podrían mostrar uno de los mecanismos que poseen las células del EPR para hacer frente a estos niveles de VEGF aumentados. Cuando los exosomas provenientes del EPR dañado, y por ello, con más VEGFR en su membrana interaccionen con otras células del EPR podrían facilitarles a estas nuevas células más VEGFR para que los incorporen a su membrana celular. Además, estos exosomas también liberarían su contenido en ácidos nucleicos al citosol pudiendo inducir un aumento en la expresión de VEGFR en las células diana.

Nuestro estudio, pese a lo limitado del tamaño muestral, muestra diferencias francas en los niveles de exosomas CD9 circulantes entre los pacientes con DMAE exudativa y los pacientes con ausencia de patología retiniana. Aunque dentro de los criterios de exclusión se encontraba la presencia de patología neoplásica sistémica u ocular concomitante, por el riesgo de producir una alteración en los niveles plasmáticos de exosomas pues los procesos neoplásicos ocasionan

un aumento de liberación de estas microvesículas [Janowska-Wieczorek et al. 2005; Skog et al. 2008], no hemos considerado otras patologías como la diabetes mellitus [Safdar et al. 2016], la enfermedad cardiovascular [Lawson et al. 2016] o enfermedades autoinmunes [Tan et al. 2016d] que se han visto que también pueden influir. No obstante, al emplear anticuerpos anti - RPE65 para el marcaje de los exosomas minimizamos la influencia de otras comorbilidades y encontramos cambios estadísticamente significativos entre las dos cohortes de pacientes, encontrando mayores niveles en los casos de DMAE exudativa.

Estos resultados parecen ser representativos de la patogenia de la DMAE y de la influencia de los exosomas en la misma. Por primera vez se han comparado los niveles de exosomas circulantes en un grupo de pacientes sanos y en un grupo con DMAE exudativa encontrando evidencia *in vivo* de que las células del EPR de pacientes con DMAE neovascular producen mayor cantidad de exosomas. Posteriores estudios en esta línea nos podrían dar nueva información de gran utilidad para el manejo de la DMAE. Por un lado, sería posible valorar el papel de los exosomas circulantes CD9RPE65 como biomarcadores, valorando si existen diferencias en los distintos estadios de la enfermedad y su posible utilidad para un *screening* precoz de los casos avanzados. Además, también podrían emplearse como herramienta adicional para la creación de protocolos individualizados de tratamiento, donde se pudieran establecer unos niveles predefinidos de exosomas plasmáticos para valorar la necesidad de una nueva inyección de antiVEGF o el momento más adecuado para finalizar el tratamiento. Así mismo, estas microvesículas podrían utilizarse como vehículos de fármacos antiVEGF con la ventaja de actuar directamente sobre las células diana y de poder potenciar su efecto empleando los mecanismos de comunicación celular.

## Capítulo 6

# Conclusiones

### 6.1 Conclusiones

1. Un año de tratamiento con aflibercept en protocolo TE en pacientes con DMAE naive constituye una opción terapéutica eficaz presentando ganancias funcionales y anatómicas, no siendo necesario realizar un número diferente de inyecciones y / o visitas en función del subtipo de complejo neovascular.
2. A lo largo del periodo de seguimiento se ha observado una disminución de los parámetros exudativos (LSR, FIR, presencia de DEP y altura del mismo) y una restitución de la integridad de las capas externas de la retina (MLE y ZE).
3. El GMC, el DEP máximo y el DEP en las 500 $\mu$  nasales y temporales a la fóvea han demostrado constituir factores pronósticos negativos sobre la AV final en escala logMAR. Por el contrario, la longitud de la MLE y de la ZE en la zona subfoveal constituyen factores pronósticos positivos de la misma.
4. Con el tratamiento con aflibercept, se encuentra una disminución del grosor coroideo en todo el área macular.
5. Existe un aumento significativo de exosomas CD9RPE65 circulantes en plasma en pacientes con DMAE exudativa frente a pacientes sanos sin enfermedad retiniana.



# Apéndices



## Apéndice A

# Informe del comité ético de investigación clínica I

## INFORME DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

### - ANEXO 4 -

Dr. Severiano Marín Bertolin

Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Valencia

#### CERTIFICA

Este CEIC ha evaluado en su reunión de 29 de Octubre de 2015 el Estudio:

PROTOCOLO:	VNC-AFL-2015-01	Promotor	Veronica Castro Navarro
Título:	Cambios en la ultraestructura de la retina externa en pacientes con degeneración macular asociada a la edad exudativa tratados con aflibercept		
I.P.:	Dra. Veronica Castro Navarro	Servicio/Unidad	Oftalmología

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo y final en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.  
 Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el HIP y Consentimiento Informado general versión final, como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio. La capacidad del Investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio. El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos. Y que este Comité acepta que dicho Estudio sea realizado en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia en el servicio de Oftalmología, como investigadora principal la Dra. Castro

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente	Ausente	Disculpa
Presidente	Dr. Severiano Marín Bertolin	x		
	D. Ernesto Bataller Alonso			x
	D. Alejandro Moner González	x		
Miembros Lego	Dña. M <sup>a</sup> Teresa Jareño Roglan		x	
	Dña. Encarna Domingo Cebrián	x		
	D. Jaime Alapont Pérez	x		
	Dña. Carmen Sarmiento Cabañes	X		
	D. Antonio Baltasar Olivas Nevado		x	
	Dr. D. José Manuel Iranzo Miguélez		X	
	Dr. D. Miguel Armengot Carceller	x		
Vocales	Dr. D. Julio Cortijo Gimeno			x
	Dra. Dña. Elena Rubio Gomis	x		
	Dr. D. Gustavo Juan Samper	x		
	Dra. Pilar Blasco Segura	x		

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

	Presente	Ausente	Disculpa
Dra. M <sup>a</sup> José Safont Aguilera	x		
Dra. Ana Blasco Cordellat			x
Dr. Antonio Martorell Aragónés	x		
Dr. Aurelio Quesada Dorador		x	
Dr. Pedro Polo Martín	x		
Dra. Inmaculada Sáez Ferrer			x
Dr. Alberto Berenguer Jofresa		x	
Dra. Goitzane Marcaida Benito	X		
Dr. Javier Milara Payá	x		
Secretario Dra. Ana Mínguez Martí	X		

En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente- Real Decreto 223/2004- para que la decisión del citado CEIC sea válida. El CEIC en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 09 de noviembre de 2015

Fdo. Dr Severiano Marin Bertolin  
(Presidente CEIC CHGUV)

CONSORCI  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA  
COMITÉ ÈTIC DE  
INVESTIGACIÓ CLÍNICA



## Apéndice B

# Informe del comité ético de investigación clínica II

## INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACION CLINICA

### - ANEXO 4 -

D<sup>a</sup>. Elena Rubio Gomis

Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Valencia

#### CERTIFICA

Este CEIm ha evaluado en su reunión de 7 de Abril de 2016 el ESTUDIO:

PROTOCOLO:	<b>VCN-AFL-2015-02</b>	Promotor	Veronica Castro Navarro
Título:	CUANTIFICACIÓN / ANÁLISIS DE EXOSOMAS PLASMÁTICOS CIRCULANTES RPE-65-CD9+ EN PACIENTES CON DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD EXUDATIVA TRATADOS CON AFLIBERCEPT"		
I.P.:	Dra. Veronica Castro Navarro	Servicio/Unidad	Oftalmología

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo versión septiembre 2014 en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto. Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el HIP y Consentimiento Informado versión 1 de noviembre 2015, como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio  
La capacidad del Investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio  
El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.  
Y que este Comité acepta que dicho Estudio sea realizado en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia en el Servicio de Oftalmología, como investigadora principal la Dra .Castro  
**Al ser un estudio observacional con clasificación SP se va necesitar la resolución de la CCAA para poder iniciar el Estudio.**

Los miembros que evaluaron esta documentación:

	Presente	Ausente	Disculpa
Presidente			
Dra. Dña. Elena Rubio Gomis	X		
D. Ernesto Bataller Alonso		X	
D. Alejandro Moner González	X		
Dña. M <sup>a</sup> Teresa Jareño Roglan	X		
Miembros Lego			X
Dña. Encarna Domingo Cebrián			X
D. Jaime Alapont Pérez	X		
Dña. Carmen Sarmiento Cabañes	X		
D. Antonio Baltasar Olivas Nevado		X	
Dr. D. Enrique Ortega Gonzalez			X
Dr. D. Miguel Armengot Carceller	X		
Vocales			
Dr. D. Julio Cortijo Gimeno	X		
Dr. D. Gustavo Juan Samper	X		
Dra. Pilar Blasco Segura			X

Consortio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

	Presente	Ausente	Disculpa
Dra. M <sup>a</sup> José Safont Aguilera	x		
Dra. Ana Blasco Cordellat	x		
Dr. Antonio Martorell Aragonés	x		
Dr. Aurelio Quesada Dorador			x
Dr. Pedro Polo Martin	x		
Dr. Alberto Berenguer Jofresa	x		
Dra. Goitzane Marcaida Benito	X		
Dr. Javier Milara Payá	x		
Dr. Elías Ruiz Rojo	X		

Secretario

En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente- Real Decreto 223/2004- para que la decisión del citado CEIM sea válida. El CEIC en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIM es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 23 de junio de 2016

Fdo. Dra. Elena Rubio Gomis  
(Presidenta CEIC CHGUV)



COMITÉ ÉTICO DE  
INVESTIGACIÓN CLÍNICA



# Bibliografía

- Aboul Naga, S. H., Dithmer, M., Chitadze, G., Kabelitz, D., Lucius, R., Roider, J. y Klettner, A. (2015). «Intracellular pathways following uptake of bevacizumab in RPE cells». En: *Exp. Eye Res.* 131, págs. 29-41.
- Abramoff, M. D., Garvin, M. K. y Sonka, M. (2010). «Retinal Imaging and Image Analysis». En: *IEEE Trans Med Imaging* 3, págs. 169-208.
- Agarwal, A., Aggarwal, K. y Gupta, V. (2016). «Management of Neovascular Age-related Macular Degeneration: A Review on Landmark Randomized Controlled Trials». En: *Middle East Afr J Ophthalmol* 23.1, págs. 27-37.
- Aharon, A. y Brenner, B. (2009). «Microparticles, thrombosis and cancer». En: *Best Pract Res Clin Haematol* 22.1, págs. 61-69.
- Akagi-Kurashige, Y., Tsujikawa, A., Oishi, A., Ooto, S., Yamashiro, K., Tamura, H., Nakata, I., Ueda-Arakawa, N. y Yoshimura, N. (2012). «Relationship between retinal morphological findings and visual function in age-related macular degeneration». En: *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 250.8, págs. 1129-1136.
- Akcay, B. I., Kardes, E., Macin, S., Unlu, C., Ozgurhan, E. B., Macin, A., Bozkurt, T. K., Ergin, A. y Surmeli, R. (2016). «Evaluation of Subfoveal Choroidal Thickness in Internal Carotid Artery Stenosis». En: *J Ophthalmol* 2016, pág. 5296048.
- Alexander, S. L., Linde-Zwirble, W. T., Werther, W., Depperschmidt, E. E., Wilson, L. J., Palanki, R., Saroj, N., Butterworth, S. L. y Ianchulev, T. (2007). «Annual rates of arterial thromboembolic events in medicare neovascular age-related macular degeneration patients». En: *Ophthalmology* 114.12, págs. 2174-2178.

- Amoaku, W. M., Chakravarthy, U., Gale, R., Gavin, M., Ghanchi, F., Gibson, J., Harding, S., Johnston, R. L., Kelly, S. P., Lotery, A., Mahmood, S., Menon, G., Sivaprasad, S., Talks, J., Tufail, A. y Yang, Y. (2015). «Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD». En: *Eye (Lond)* 29.10, págs. 1397-1398.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A. y Aggarwal, B. B. (2007). «Bioavailability of curcumin: problems and promises». En: *Mol. Pharm.* 4.6, págs. 807-818.
- Ardeljan, D. y Chan, C. C. (2013). «Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging». En: *Prog Retin Eye Res* 37, págs. 68-89.
- Arias, L., Roman, I., Masuet-Aumatell, C., Rubio, M. J., Caminal, J. M., Catala, J. y Pujol, O. (2011). «One-year results of a flexible regimen with ranibizumab therapy in macular degeneration: relationship with the number of injections». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 31.7, págs. 1261-1267.
- Arnold, J. J. et al. (2015). «Two-year outcomes of "treat and extend" intravitreal therapy for neovascular age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 122.6, págs. 1212-1219.
- Aronow, M. E. y Chew, E. Y. (2014). «Age-related Eye Disease Study 2: perspectives, recommendations, and unanswered questions». En: *Curr Opin Ophthalmol* 25.3, págs. 186-190.
- Arora, K. S., Jefferys, J. L., Maul, E. A. y Quigley, H. A. (2012). «The choroid is thicker in angle closure than in open angle and control eyes». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53.12, págs. 7813-7818.
- Atienzar-Aroca, S., Flores-Bellver, M., Serrano-Heras, G., Martinez-Gil, N., Barcia, J. M., Aparicio, S., Perez-Cremades, D., Garcia-Verdugo, J. M., Diaz-Llopis, M., Romero, F. J. y Sancho-Pelluz, J. (2016). «Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells». En: *J. Cell. Mol. Med.* 20.8, págs. 1457-1466.
- Ba, J., Peng, R. S., Xu, D., Li, Y. H., Shi, H., Wang, Q. y Yu, J. (2015). «Intravitreal anti-VEGF injections for treating wet age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis». En: *Drug Des Devel Ther* 9, págs. 5397-5405.

- 
- Baek, J., Lee, J. H., Kim, J. Y., Kim, N. H. y Lee, W. K. (2016). «Geographic Atrophy and Activity of Neovascularization in Retinal Angiomatous Proliferation». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57.3, págs. 1500-1505.
- Barba, I., Garcia-Ramirez, M., Hernandez, C., Alonso, M. A., Masmiquel, L., Garcia-Dorado, D. y Simo, R. (2010). «Metabolic fingerprints of proliferative diabetic retinopathy: an 1H-NMR-based metabonomic approach using vitreous humor». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51.9, págs. 4416-4421.
- Barbazetto, I., Saroj, N., Shapiro, H., Wong, P. y Freund, K. B. (2010). «Dosing regimen and the frequency of macular hemorrhages in neovascular age-related macular degeneration treated with ranibizumab». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 30.9, págs. 1376-1385.
- Barry, O. P. y FitzGerald, G. A. (1999). «Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles». En: *Thromb. Haemost.* 82.2, págs. 794-800.
- Barthelmes, D., Campain, A., Nguyen, P., Arnold, J. J., McAllister, I. L., Simpson, J. M., Hunyor, A. P., Guymer, R., Essex, R. W., Morlet, N. y Gillies, M. C. (2016). «Effects of switching from ranibizumab to aflibercept in eyes with exudative age-related macular degeneration». En: *Br J Ophthalmol.*
- Batioglu, F., Demirel, S. y Ozmert, E. (2015). «Fundus autofluorescence imaging in age-related macular degeneration». En: *Semin Ophthalmol* 30.1, págs. 65-73.
- Bazan, N. G., Molina, M. F. y Gordon, W. C. (2011). «Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases». En: *Annu. Rev. Nutr.* 31, págs. 321-351.
- Ben Moussa, N., Georges, A., Capuano, V., Merle, B., Souied, E. H. y Querques, G. (2015). «MultiColor imaging in the evaluation of geographic atrophy due to age-related macular degeneration». En: *Br J Ophthalmol* 99.6, págs. 842-847.
- Berg, K., Hadzalic, E., Gjertsen, I., Forsaa, V., Berger, L. H., Kinge, B., Henschien, H., Fossen, K., Markovic, S., Pedersen, T. R., Sandvik, L. y Bragadottir, R. (2016). «Ranibizumab or Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration According to the Lu-

- centis Compared to Avastin Study Treat-and-Extend Protocol: Two-Year Results». En: *Ophthalmology* 123.1, págs. 51-59.
- Berg, K., Pedersen, T. R., Sandvik, L. y Bragadottir, R. (2015). «Comparison of ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration according to LUCAS treat-and-extend protocol». En: *Ophthalmology* 122.1, págs. 146-152.
- Bernardes, R., Serranho, P. y Lobo, C. (2011). «Digital ocular fundus imaging: a review». En: *Ophthalmologica* 226.4, págs. 161-181.
- Bhutto, I. A., Baba, T., Merges, C., Juriasinghani, V., McLeod, D. S. y Lutty, G. A. (2011). «C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration». En: *Br J Ophthalmol* 95.9, págs. 1323-1330.
- Biasutto, L., Chiechi, A., Couch, R., Liotta, L. A. y Espina, V. (2013). «Retinal pigment epithelium (RPE) exosomes contain signaling phosphoproteins affected by oxidative stress». En: *Exp. Cell Res.* 319.13, págs. 2113-2123.
- Bindewald, A., Bird, A. C., Dandekar, S. S., Dolar-Szczasny, J., Dreyhaupt, J., Fitzke, F. W., Einbock, W., Holz, F. G., Jorzik, J. J., Keilhauer, C., Lois, N., Mlynski, J., Pauleikhoff, D., Staurenghi, G. y Wolf, S. (2005). «Classification of fundus autofluorescence patterns in early age-related macular disease». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46.9, págs. 3309-3314.
- Bird, A. C., Bressler, N. M., Bressler, S. B., Chisholm, I. H., Coscas, G., Davis, M. D., Jong, P. T. de, Klaver, C. C., Klein, B. E. y Klein, R. (1995). «An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group». En: *Surv Ophthalmol* 39.5, págs. 367-374.
- Bloch, S. B., Lund-Andersen, H., Sander, B. y Larsen, M. (2013). «Subfoveal fibrosis in eyes with neovascular age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab». En: *Am. J. Ophthalmol.* 156.1, págs. 116-124.
- Boiko, E. V. y Maltsev, D. S. (2016). «Retro-Mode Scanning Laser Ophthalmoscopy Planning for Navigated Macular Laser Photocoagulation in Macular Edema». En: *J Ophthalmol* 2016, pág. 3726353.

- Bonnet, C., Querques, G., Zerbib, J., Oubraham, H., Garavito, R. B., Puche, N. y Souied, E. H. (2014). «Hyperreflective pyramidal structures on optical coherence tomography in geographic atrophy areas». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 34.8, págs. 1524-1530.
- Boulton, M. y Dayhaw-Barker, P. (2001). «The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes». En: *Eye (Lond)* 15.Pt 3, págs. 384-389.
- Boycott, B. B. y Wassle, H. (1991). «Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina». En: *Eur. J. Neurosci.* 3.11, págs. 1069-1088.
- Boyer, D. S., Antoszyk, A. N., Awh, C. C., Bhisitkul, R. B., Shapiro, H. y Acharya, N. R. (2007). «Subgroup analysis of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 114.2, págs. 246-252.
- Broadhead, G. K., Hong, T., Zhu, M., Li, H., Schlub, T. E., Wijeyakumar, W. y Chang, A. A. (2015). «Response of pigment epithelial detachments to intravitreal aflibercept among patients with treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.5, págs. 975-981.
- Brown, D. M., Heier, J. S., Ciulla, T., Benz, M., Abraham, P., Yancopoulos, G., Stahl, N., Ingerman, A., Vitti, R., Berliner, A. J., Yang, K. y Nguyen, Q. D. (2011). «Primary endpoint results of a phase II study of vascular endothelial growth factor trap-eye in wet age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 118.6, págs. 1089-1097.
- Brown, D. M., Kaiser, P. K., Michels, M., Soubrane, G., Heier, J. S., Kim, R. Y., Sy, J. P. y Schneider, S. (2006). «Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration». En: *N. Engl. J. Med.* 355.14, págs. 1432-1444.
- Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. y Bonnerot, C. (2005). «Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma». En: *Int. Immunol.* 17.7, págs. 879-887.
- Campochiaro, P. A. (2015). «Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases». En: *Prog Retin Eye Res* 49, págs. 67-81.
- Casaroli-Marano, R. et al. (2011). «Prevalence of age-related macular degeneration in Spain». En: *Br J Ophthalmol* 95.7, págs. 931-936.

- Celik, N., Scheuerle, A., Auffarth, G. U., Kopitz, J. y Dithmar, S. (2015). «Intraocular Pharmacokinetics of Afibercept and Vascular Endothelial Growth Factor-A». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56.9, págs. 5574-5578.
- Cervera, R. E., Castro, V., Montero, J., Torralba, C. y Gracia, A. (2014). «[Initial experience with aflibercept in the management of patients with wet age-related macular degeneration refractory to ranibizumab and/or bevacizumab]». En: *Arch Soc Esp Ophthalmol* 89.1, págs. 42-43.
- Chae, B., Jung, J. J., Mrejen, S., Gallego-Pinazo, R., Yannuzzi, N. A., Patel, S. N., Chen, C. Y., Marsiglia, M., Boddu, S. y Freund, K. B. (2015). «Baseline Predictors for Good Versus Poor Visual Outcomes in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration With Intravitreal Anti-VEGF Therapy». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56.9, págs. 5040-5047.
- Chaikitmongkol, V., Tadarati, M. y Bressler, N. M. (2016). «Recent approaches to evaluating and monitoring geographic atrophy». En: *Curr Opin Ophthalmol* 27.3, págs. 217-223.
- Chalam, K. V. y Sambhav, K. (2016). «Optical Coherence Tomography Angiography in Retinal Diseases». En: *J Ophthalmic Vis Res* 11.1, págs. 84-92.
- Chen, H., Liu, B., Lukas, T. J. y Neufeld, A. H. (2008a). «The aged retinal pigment epithelium/choroid: a potential substratum for the pathogenesis of age-related macular degeneration». En: *PLoS ONE* 3.6, e2339.
- Chen, X. et al. (2008b). «Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases». En: *Cell Res.* 18.10, págs. 997-1006.
- Chew, E. Y. et al. (2013). «Long-term effects of vitamins C and E, Î<sup>2</sup>-carotene, and zinc on age-related macular degeneration: AREDS report no. 35». En: *Ophthalmology* 120.8, págs. 1604-1611.
- Chirco, K. R., Sohn, E. H., Stone, E. M., Tucker, B. A. y Mullins, R. F. (2016). «Structural and molecular changes in the aging choroid: implications for age-related macular degeneration». En: *Eye (Lond)*.

- Cho, H. J., Kim, H. S., Yoo, S. G., Han, J. I., Lew, Y. J., Cho, S. W., Lee, T. G. y Kim, J. W. (2015). «Retinal pigment epithelial tear after intravitreal ranibizumab treatment for retinal angiomatous proliferation». En: *Am. J. Ophthalmol.* 160.5, págs. 1000-1005.
- (2016). «Retinal pigment epithelium tear after intravitreal ranibizunab treatment for neovascular age-related macular degeneration». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)*
- Cimarolli, V. R., Casten, R. J., Rovner, B. W., Heyl, V., Sorensen, S. y Horowitz, A. (2016). «Anxiety and depression in patients with advanced macular degeneration: current perspectives». En: *Clin Ophthalmol* 10, págs. 55-63.
- Clayton, A., Harris, C. L., Court, J., Mason, M. D. y Morgan, B. P. (2003). «Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59». En: *Eur. J. Immunol.* 33.2, págs. 522-531.
- Colombo, M., Moita, C., Niel, G. van, Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., They, C. y Raposo, G. (2013). «Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles». En: *J. Cell. Sci.* 126.Pt 24, págs. 5553-5565.
- Coscas, F., Coscas, G., Lupidi, M., Dirani, A., Srour, M., Semoun, O., Francais, C. y Souied, E. H. (2015a). «Restoration of Outer Retinal Layers After Afibercept Therapy in Exudative AMD: Prognostic Value». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56.6, págs. 4129-4134.
- Coscas, G. J., Lupidi, M., Coscas, F., Cagini, C. y Souied, E. H. (2015b). «Optical coherence tomography angiography versus traditional multimodal imaging in assessing the activity of exudative age-related macular degeneration: A new diagnostic challenge». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.11, págs. 2219-2228.
- Coscas, G., Lupidi, M., Coscas, F., Benjelloun, F., Zerbib, J., Dirani, A., Semoun, O. y Souied, E. H. (2015c). «Toward a specific classification of polypoidal choroidal vasculopathy: idiopathic disease or subtype of age-related macular degeneration». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56.5, págs. 3187-3195.
- Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M. E., Salomon, R. G. y Hollyfield, J. G. (2002). «Drusen proteome

- analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99.23, págs. 14682-14687.
- Csaky, K. G., Richman, E. A. y Ferris, F. L. (2008). «Report from the NEI/FDA Ophthalmic Clinical Trial Design and Endpoints Symposium». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49.2, págs. 479-489.
- Cunningham, E. T., Feiner, L., Chung, C., Tuomi, L. y Ehrlich, J. S. (2011). «Incidence of retinal pigment epithelial tears after intravitreal ranibizumab injection for neovascular age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 118.12, págs. 2447-2452.
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Packer, O., Hendrickson, A. E. y Kalina, R. E. (1987). «Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry». En: *Science* 236.4801, págs. 579-582.
- Daniel, E., Toth, C. A., Grunwald, J. E., Jaffe, G. J., Martin, D. F., Fine, S. L., Huang, J., Ying, G. S., Hagstrom, S. A., Winter, K. y Maguire, M. G. (2014). «Risk of scar in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials». En: *Ophthalmology* 121.3, págs. 656-666.
- Daniel, E. et al. (2016). «Outcomes in Eyes with Retinal Angiomatous Proliferation in the Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT)». En: *Ophthalmology* 123.3, págs. 609-616.
- Davis, M. D., Gangnon, R. E., Lee, L. Y., Hubbard, L. D., Klein, B. E., Klein, R., Ferris, F. L., Bressler, S. B. y Milton, R. C. (2005). «The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17». En: *Arch. Ophthalmol.* 123.11, págs. 1484-1498.
- De Bats, F., Mathis, T., Mauget-Faÿsse, M., Joubert, F., Denis, P. y Kodjikian, L. (2016). «Prevalence of reticular pseudodrusen in age-related macular degeneration using multimodal imaging». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 36.1, págs. 46-52.
- Despreaux, R., Cohen, S. Y., Semoun, O., Zambrowski, O., Jung, C., Oubraham, H. y Souied, E. H. (2016). «Short-term results of switchback from aflibercept to ranibizumab in neovas-

- cular age-related macular degeneration in clinical practice». En: *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 254.4, págs. 639-644.
- Dirani, A., Ambresin, A., Marchionno, L., Decugis, D. y Mantel, I. (2015). «Factors Influencing the Treatment Response of Pigment Epithelium Detachment in Age-Related Macular Degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 160.4, págs. 732-738.
- Domalpally, A., Danis, R., Agron, E., Blodi, B., Clemons, T. y Chew, E. (2016). «Evaluation of geographic atrophy from color photographs and fundus autofluorescence images: Age-Related Eye Disease Study 2 Report Number 11». En: *Ophthalmology*.
- Duchin, K. S., Asefzadeh, B., Poulaki, V., Rett, D., Marescalchi, P. y Cavallerano, A. (2015). «Telereitinal imaging for detection of referable macular degeneration». En: *Optom Vis Sci* 92.6, págs. 714-718.
- Ebnetter, A., Jaggi, D., Abegg, M., Wolf, S. y Zinkernagel, M. S. (2016). «Relationship between presumptive inner nuclear layer thickness and geographic atrophy progression in age-related macular degeneration». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57.9, págs. 299-306.
- Ebrahimi, K. B., Fijalkowski, N., Cano, M. y Handa, J. T. (2014). «Oxidized low-density-lipoprotein-induced injury in retinal pigment epithelium alters expression of the membrane complement regulatory factors CD46 and CD59 through exosomal and apoptotic bleb release». En: *Adv. Exp. Med. Biol.* 801, págs. 259-265.
- Eissa, S., Matboli, M., Aboushahba, R., Bekhet, M. M. y Soliman, Y. (2016). «Urinary exosomal microRNA panel unravels novel biomarkers for diagnosis of type 2 diabetic kidney disease». En: *J. Diabetes Complicat.*
- Eldh, M., Ekstrom, K., Valadi, H., Sjostrand, M., Olsson, B., Jernas, M. y Lotvall, J. (2010). «Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA». En: *PLoS ONE* 5.12, e15353.
- Ellabban, A. A., Tsujikawa, A., Ogino, K., Ooto, S., Yamashiro, K., Oishi, A. y Yoshimura, N. (2012). «Choroidal thickness after intravitreal ranibizumab injections for choroidal neovascularization». En: *Clin Ophthalmol* 6, págs. 837-844.

- Engelbert, M., Zweifel, S. A. y Freund, K. B. (2009). «"Treat and extend"dosing of intravitreal antivascular endothelial growth factor therapy for type 3 neovascularization/retinal angiomatous proliferation». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 29.10, págs. 1424-1431.
- (2010). «Long-term follow-up for type 1 (subretinal pigment epithelium) neovascularization using a modified "treat and extend"dosing regimen of intravitreal antivascular endothelial growth factor therapy». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 30.9, págs. 1368-1375.
- Epstein, D. y Amren, U. (2016). «Near vision outcome in patients with age-related macular degeneration treated with aflibercept». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)*
- Esen, F., Alhan, O., Kuru, P. y Sahin, O. (2016). «Safety assessment and power analyses in published Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Randomized Controlled Trials». En: *Am. J. Ophthalmol.*
- Esmacelpour, M., Ansari-Shahrezaei, S., Glittenberg, C., Nemetz, S., Kraus, M. F., Hornegger, J., Fujimoto, J. G., Drexler, W. y Binder, S. (2014). «Choroid, Haller's, and Sattler's layer thickness in intermediate age-related macular degeneration with and without fellow neovascular eyes». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55.8, págs. 5074-5080.
- Esmacelpour, M., Povazay, B., Hermann, B., Hofer, B., Kajic, V., Kapoor, K., Sheen, N. J., North, R. V. y Drexler, W. (2010). «Three-dimensional 1060-nm OCT: choroidal thickness maps in normal subjects and improved posterior segment visualization in cataract patients». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51.10, págs. 5260-5266.
- Falkenstein, I. A., Cochran, D. E., Azen, S. P., Dustin, L., Tammewar, A. M., Kozak, I. y Freeman, W. R. (2008). «Comparison of visual acuity in macular degeneration patients measured with snellen and early treatment diabetic retinopathy study charts». En: *Ophthalmology* 115.2, págs. 319-323.
- Fauser, S. y Muether, P. S. (2016). «Clinical correlation to differences in ranibizumab and aflibercept vascular endothelial growth factor suppression times». En: *Br J Ophthalmol.*
- Fauser, S., Schwabecker, V. y Muether, P. S. (2014). «Suppression of intraocular vascular endothelial growth factor during aflibercept treatment of age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 158.3, págs. 532-536.

- Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q. y Sui, S. F. (2010). «Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis». En: *Traffic* 11.5, págs. 675-687.
- Fernandes, L. H., Freund, K. B., Yannuzzi, L. A., Spaide, R. F., Huang, S. J., Slakter, J. S. y Sorenson, J. A. (2002). «The nature of focal areas of hyperfluorescence or hot spots imaged with indocyanine green angiography». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 22.5, págs. 557-568.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P. y Novotny, W. (2004). «Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer». En: *Nat Rev Drug Discov* 3.5, págs. 391-400.
- Ferris, F. L. y Bailey, I. (1996). «Standardizing the measurement of visual acuity for clinical research studies: Guidelines from the Eye Care Technology Forum». En: *Ophthalmology* 103.1, págs. 181-182.
- Ferris, F. L., Davis, M. D., Clemons, T. E., Lee, L. Y., Chew, E. Y., Lindblad, A. S., Milton, R. C., Bressler, S. B. y Klein, R. (2005). «A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18». En: *Arch. Ophthalmol.* 123.11, págs. 1570-1574.
- Ferris, F. L., Kassoff, A., Bresnick, G. H. y Bailey, I. (1982). «New visual acuity charts for clinical research». En: *Am. J. Ophthalmol.* 94.1, págs. 91-96.
- Ferris, F. L. et al. (2013). «Clinical classification of age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 120.4, págs. 844-851.
- Fingler, J., Zawadzki, R. J., Werner, J. S., Schwartz, D. y Fraser, S. E. (2009). «Volumetric microvascular imaging of human retina using optical coherence tomography with a novel motion contrast technique». En: *Opt Express* 17.24, págs. 22190-22200.
- Fish, J. E., Santoro, M. M., Morton, S. U., Yu, S., Yeh, R. F., Wythe, J. D., Ivey, K. N., Bruneau, B. G., Stainier, D. Y. y Srivastava, D. (2008). «miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity». En: *Dev. Cell* 15.2, págs. 272-284.
- Fleckenstein, M., Charbel Issa, P., Helb, H. M., Schmitz-Valckenberg, S., Finger, R. P., Scholl, H. P., Loeffler, K. U. y Holz, F. G. (2008). «High-resolution spectral domain-OCT ima-

- ging in geographic atrophy associated with age-related macular degeneration». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49.9, págs. 4137-4144.
- Fleckenstein, M., Grassmann, F., Lindner, M., Pfau, M., Czauderna, J., Strunz, T., Strachwitz, C. von, Schmitz-Valckenberg, S., Holz, F. G. y Weber, B. H. (2016). «Distinct genetic risk profile of the rapidly progressing diffuse-trickling subtype of geographic atrophy in Age-Related Macular Degeneration (AMD)». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57.6, págs. 2463-2471.
- Fletcher, D. C. y Schuchard, R. A. (1997). «Preferred retinal loci relationship to macular scotomas in a low-vision population». En: *Ophthalmology* 104.4, págs. 632-638.
- Foster, B. P., Balassa, T., Benen, T. D., Dominovic, M., Elmadjian, G. K., Florova, V., Francolet, M. D., Kestlerova, A., Kmiecik, G., Kostadinova, I. A., Kyvelidou, C., Meggyes, M., Mincheva, M. N., Moro, L., Pastuschek, J., Spoldi, V., Wandernoth, P., Weber, M., Toth, B. y Markert, U. R. (2016). «Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction». En: *Crit Rev Clin Lab Sci*, págs. 1-17.
- Fox, I. J. y Wood, E. H. (1960). «Indocyanine green: physical and physiologic properties». En: *Proc Staff Meet Mayo Clin* 35, págs. 732-744.
- Frampton, J. E. (2012). «Aflibercept for intravitreal injection: in neovascular age-related macular degeneration». En: *Drugs Aging* 29.10, págs. 839-846.
- Freund, K. B., Korobelnik, J. F., Devenyi, R., Framme, C., Galic, J., Herbert, E., Hoerauf, H., Lanzetta, P., Michels, S., Mitchell, P., Mones, J., Regillo, C., Tadayoni, R., Talks, J. y Wolf, S. (2015). «Treat-and-extend regimens with anti-VEGF agents in retinal diseases: A literature review and consensus recommendations». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.8, págs. 1489-1506.
- Freund, K. B., Mrejen, S. y Gallego-Pinazo, R. (2013). «An update on the pharmacotherapy of neovascular age-related macular degeneration». En: *Expert Opin Pharmacother* 14.8, págs. 1017-1028.

- Freund, K. B., Yannuzzi, L. A. y Sorenson, J. A. (1993). «Age-related macular degeneration and choroidal neovascularization». En: *Am. J. Ophthalmol.* 115.6, págs. 786-791.
- Freund, K. B., Zweifel, S. A. y Engelbert, M. (2010). «Do we need a new classification for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration?» En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 30.9, págs. 1333-1349.
- Gallego-Pinazo, R., Monje-Fernandez, L., Garcia-Marin, N., Andreu-Fenoll, M. y Dolz-Marco, R. (2016). «Implications of the anatomical classification of the neovascular form of age-related macular degeneration». En: *Arch Soc Esp Oftalmol.*
- Gangalum, R. K., Bhat, A. M., Kohan, S. A. y Bhat, S. P. (2016). «Inhibition of the expression of the small heat shock protein  $\alpha$ -B-crystallin inhibits exosome secretion in human retinal pigment epithelial cells in culture». En: *J. Biol. Chem.* 291.25, págs. 12930-12942.
- Garcia-Layana, A., Figueroa, M. S., Araiz, J., Ruiz-Moreno, J. M., Gomez-Ulla, F., Arias-Barquet, L. y Reiter, N. (2015). «Treatment of exudative age-related macular degeneration: Focus on aflibercept». En: *Drugs Aging* 32.10, págs. 797-807.
- Gass, J. D. (1994). «Biomicroscopic and histopathologic considerations regarding the feasibility of surgical excision of subfoveal neovascular membranes». En: *Am. J. Ophthalmol.* 118.3, págs. 285-298.
- George, S., Cooke, C. y Chakravarthy, U. (2010). «Exudative AMD subtypes and eligibility for treatment with ranibizumab». En: *Eye (Lond)* 24.7, págs. 1247-1251.
- Ghidoni, R., Benussi, L. y Binetti, G. (2008). «Exosomes: the Trojan horses of neurodegeneration». En: *Med. Hypotheses* 70.6, págs. 1226-1227.
- Gianniou, C., Dirani, A., Jang, L. y Mantel, I. (2015). «Refractory intraretinal or subretinal fluid in neovascular age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab: Functional and structural outcome». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.6, págs. 1195-1201.
- Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholakh, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y. y Chajut, A. (2008). «Serum microRNAs are promising novel biomarkers». En: *PLoS ONE* 3.9, e3148.

- Gobel, A. P., Fleckenstein, M., Schmitz-Valckenberg, S., Brinkmann, C. K. y Holz, F. G. (2011). «Imaging geographic atrophy in age-related macular degeneration». En: *Ophthalmologica* 226.4, págs. 182-190.
- Goldberg, M. F., Dhaliwal, R. S. y Olk, R. J. (1998). «Indocyanine green angiography patterns of zones of relative decreased choroidal blood flow in patients with exudative age-related macular degeneration». En: *Ophthalmic Surg Lasers* 29.5, págs. 385-390.
- Gonzalez Martin-Moro, J., Hernandez Verdejo, J. L. y Azurza Rivas, G. (2016). «History and pre-history of optotypes: From Alcor and Mizar to the ETDRS optotype». En: *Arch Soc Esp Oftalmol*.
- Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Feinsod, M. y Guyer, D. R. (2004). «Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration». En: *N. Engl. J. Med.* 351.27, págs. 2805-2816.
- Grassmann, F., Schoenberger, P. G., Brandl, C., Schick, T., Hasler, D., Meister, G., Fleckenstein, M., Lindner, M., Helbig, H., Fauser, S. y Weber, B. H. (2014). «A circulating microrRNA profile is associated with late-stage neovascular age-related macular degeneration». En: *PLoS ONE* 9.9, e107461.
- Green, W. R. y Enger, C. (1993). «Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture». En: *Ophthalmology* 100.10, págs. 1519-1535.
- Gross, N. E., Aizman, A., Brucker, A., Klancnik, J. M. y Yannuzzi, L. A. (2005). «Nature and risk of neovascularization in the fellow eye of patients with unilateral retinal angiomatous proliferation». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 25.6, págs. 713-718.
- Grossniklaus, H. E. y Green, W. R. (2004). «Choroidal neovascularization». En: *Am. J. Ophthalmol.* 137.3, págs. 496-503.
- Group, Age Related Eye Disease Study Research (2000). «Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3». En: *Ophthalmology* 107.12, págs. 2224-2232.

- Group, Macular Photocoagulation Study (1991). «Subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Guidelines for evaluation and treatment in the macular photocoagulation study. Macular Photocoagulation Study Group». En: *Arch. Ophthalmol.* 109.9, págs. 1242-1257.
- Grunwald, J. E., Daniel, E., Huang, J., Ying, G. S., Maguire, M. G., Toth, C. A., Jaffe, G. J., Fine, S. L., Blodi, B., Klein, M. L., Martin, A. A., Hagstrom, S. A. y Martin, D. F. (2014). «Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials». En: *Ophthalmology* 121.1, págs. 150-161.
- Gu, J., Pauer, G. J., Yue, X., Narendra, U., Sturgill, G. M., Bena, J., Gu, X., Peachey, N. S., Salomon, R. G., Hagstrom, S. A. y Crabb, J. W. (2010). «Proteomic and genomic biomarkers for age-related macular degeneration». En: *Adv. Exp. Med. Biol.* 664, págs. 411-417.
- Gupta, T., Kapoor, K., Sahni, D. y Singh, B. (2016). «Mapping the time line of development in each layer of human foetal retina». En: *J Clin Diagn Res* 10.3, págs. 04-7.
- Ha, D., Yang, N. y Nadithe, V. (2016). «Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges». En: *Acta Pharm Sin B* 6.4, págs. 287-296.
- Hackett, S. F., Ozaki, H., Strauss, R. W., Wahlin, K., Suri, C., Maisonpierre, P., Yancopoulos, G. y Campochiaro, P. A. (2000). «Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization». En: *J. Cell. Physiol.* 184.3, págs. 275-284.
- Hajrasouliha, A. R., Jiang, G., Lu, Q., Lu, H., Kaplan, H. J., Zhang, H. G. y Shao, H. (2013). «Exosomes from retinal astrocytes contain antiangiogenic components that inhibit laser-induced choroidal neovascularization». En: *J. Biol. Chem.* 288.39, págs. 28058-28067.
- Haller, J. A. (2013). «Current anti-vascular endothelial growth factor dosing regimens: benefits and burden». En: *Ophthalmology* 120.5 Suppl, págs. 3-7.
- Hardy, K. M., Hoffman, E. A., Gonzalez, P., McKay, B. S. y Stamer, W. D. (2005). «Extracellular trafficking of myocilin in human trabecular meshwork cells». En: *J. Biol. Chem.* 280.32, págs. 28917-28926.

- Hariri, A., Nittala, M. G. y Sadda, S. R. (2015). «Outer retinal tubulation as a predictor of the enlargement amount of geographic atrophy in age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 122.2, págs. 407-413.
- Harman, A. M., Fleming, P. A., Hoskins, R. V. y Moore, S. R. (1997). «Development and aging of cell topography in the human retinal pigment epithelium». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38.10, págs. 2016-2026.
- Hassenstein, A. y Meyer, C. H. (2009). «Clinical use and research applications of Heidelberg retinal angiography and spectral-domain optical coherence tomography - a review». En: *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 37.1, págs. 130-143.
- Hata, M., Oishi, A., Tsujikawa, A., Yamashiro, K., Miyake, M., Ooto, S., Tamura, H., Nakanishi, H., Takahashi, A., Yoshikawa, M. y Yoshimura, N. (2014). «Efficacy of intravitreal injection of aflibercept in neovascular age-related macular degeneration with or without choroidal vascular hyperpermeability». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55.12, págs. 7874-7880.
- He, L., Silva, R. A., Ayoub, N., Moshfeghi, D. M. y Leng, T. (2015). «Experience with aflibercept for the treatment of neovascular age-related macular degeneration». En: *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 46.5, págs. 542-549.
- Heier, J. S., Antoszyk, A. N., Pavan, P. R., Leff, S. R., Rosenfeld, P. J., Ciulla, T. A., Dreyer, R. F., Gentile, R. C., Sy, J. P., Hantsbarger, G. y Shams, N. (2006). «Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a phase I/II multicenter, controlled, multidose study». En: *Ophthalmology* 113.4, págs. 1-4.
- Heier, J. S., Brown, D. M., Chong, V., Korobelnik, J. F., Kaiser, P. K., Nguyen, Q. D., Kirchhof, B., Ho, A., Ogura, Y., Yancopoulos, G. D., Stahl, N., Vitti, R., Berliner, A. J., Soo, Y., Anderesi, M., Groetzbach, G., Sommerauer, B., Sandbrink, R., Simader, C. y Schmidt-Erfurth, U. (2012). «Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 119.12, págs. 2537-2548.
- Heimes, B., Farecki, M. L., Bartels, S., Barreilmann, A., Gutfleisch, M., Spital, G., Lommatzsch, A. y Pauleikhoff, D. (2016). «Retinal pigment epithelium tear and anti-vascular endothelial growth factor therapy in exudative age-related macular degeneration: Clinical course and long-term prognosis». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 36.5, págs. 868-874.

- 
- Hernandez-Martinez, P., Dolz-Marco, R., Hervas-Marin, D., Andreu-Fenoll, M., Gallego-Pinazo, R. y Arevalo, J. F. (2016). «Choroidal thickness and visual prognosis in type 1 lesion due to neovascular age-related macular degeneration». En: *Eur J Ophthalmol*.
- Hildebrand, GD. y Fielder, AR. (2011). «Anatomy and physiology of the retina». En: *Pediatric retina*. Ed. por J. Reynolds y S. Olitsky. Heidelberg: Springer, págs. 39-65.
- Hirano, A. A., Liu, X., Boulter, J., Grove, J., Perez de Sevilla Muller, L., Barnes, S. y Brecha, N. C. (2016). «Targeted deletion of vesicular GABA transporter from retinal horizontal cells eliminates feedback modulation of photoreceptor calcium channels». En: *eNeuro* 3.2.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T. y De Bruijn, E. A. (2004). «Vascular endothelial growth factor and angiogenesis». En: *Pharmacol. Rev.* 56.4, págs. 549-580.
- Hoffman, E. A., Perkumas, K. M., Highstrom, L. M. y Stamer, W. D. (2009). «Regulation of myocilin-associated exosome release from human trabecular meshwork cells». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50.3, págs. 1313-1318.
- Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., Daly, T., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D. y Rudge, J. S. (2002). «VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99.17, págs. 11393-11398.
- Holz, F. G., Amoaku, W., Donate, J., Guymer, R. H., Kellner, U., Schlingemann, R. O., Weichselberger, A. y Staurenghi, G. (2011). «Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: the SUSTAIN study». En: *Ophthalmology* 118.4, págs. 663-671.
- Holz, F. G., Bindewald-Wittich, A., Fleckenstein, M., Dreyhaupt, J., Scholl, H. P. y Schmitz-Valckenberg, S. (2007). «Progression of geographic atrophy and impact of fundus autofluorescence patterns in age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 143.3, págs. 463-472.

- Holz, F. G., Strauss, E. C., Schmitz-Valckenberg, S. y Lookeren Campagne, M. van (2014). «Geographic atrophy: clinical features and potential therapeutic approaches». En: *Ophthalmology* 121.5, págs. 1079-1091.
- Hong, C. S., Muller, L., Boyiadzis, M. y Whiteside, T. L. (2014). «Isolation and characterization of CD34+ blast-derived exosomes in acute myeloid leukemia». En: *PLoS ONE* 9.8, e103310.
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L. y Wong, R. O. (2014). «Functional architecture of the retina: development and disease». En: *Prog Retin Eye Res* 42, págs. 44-84.
- Ikuno, Y., Kawaguchi, K., Nouchi, T. y Yasuno, Y. (2010). «Choroidal thickness in healthy Japanese subjects». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51.4, págs. 2173-2176.
- Ikuno, Y. y Tano, Y. (2009). «Retinal and choroidal biometry in highly myopic eyes with spectral-domain optical coherence tomography». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50.8, págs. 3876-3880.
- Inoue, M., Kadonosono, K., Arakawa, A., Yamane, S. e Ishibashi, T. (2015). «Long-term outcome of intravitreal pegaptanib sodium as maintenance therapy in Japanese patients with neovascular age-related macular degeneration». En: *Jpn. J. Ophthalmol.* 59.3, págs. 173-178.
- Inoue, M., Yamane, S., Sato, S., Sakamaki, K., Arakawa, A. y Kadonosono, K. (2016). «Comparison of time to retreatment and visual function between ranibizumab and aflibercept in age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.*
- Iraci, N., Leonardi, T., Gessler, F., Vega, B. y Pluchino, S. (2016). «Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles». En: *Int J Mol Sci* 17.2, pág. 171.
- Ismail, N., Wang, Y., Dakhllallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T. D., Tridandapani, S., Paulaitis, M. E., Piper, M. G. y Marsh, C. B. (2013). «Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer». En: *Blood* 121.6, págs. 984-995.

- Iyer, S., Darley, P. I. y Acharya, K. R. (2010). «Structural insights into the binding of vascular endothelial growth factor-B by VEGFR-1(D2): recognition and specificity». En: *J. Biol. Chem.* 285.31, págs. 23779-23789.
- Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gomez, M., Archer, J., Hatch, S. C., Erkizia, I., Blanco, J., Borrás, F. E., Puertas, M. C., Connor, J. H., Fernandez-Figueras, M. T., Moore, L., Clotet, B., Gummuluru, S. y Martínez-Picado, J. (2009). «Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway». En: *Blood* 113.12, págs. 2732-2741.
- Jaffe, G. J. et al. (2013). «Macular morphology and visual acuity in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials». En: *Ophthalmology* 120.9, págs. 1860-1870.
- Janowska-Wieczorek, A., Wysoczynski, M., Kijowski, J., Marquez-Curtis, L., Machalinski, B., Ratajczak, J. y Ratajczak, M. Z. (2005). «Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer». En: *Int. J. Cancer* 113.5, págs. 752-760.
- Jia, Y., Bailey, S. T., Wilson, D. J., Tan, O., Klein, M. L., Flaxel, C. J., Potsaid, B., Liu, J. J., Lu, C. D., Kraus, M. F., Fujimoto, J. G. y Huang, D. (2014). «Quantitative optical coherence tomography angiography of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 121.7, págs. 1435-1444.
- Johnstone, R. M. (2005). «Revisiting the road to the discovery of exosomes». En: *Blood Cells Mol. Dis.* 34.3, págs. 214-219.
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. y Turbide, C. (1987). «Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)». En: *J. Biol. Chem.* 262.19, págs. 9412-9420.
- Jonas, J. B., Libondi, T., Ihloff, A. K., Harder, B., Kreissig, I., Schlichtenbrede, F., Sauder, G. y Spandau, U. H. (2007). «Visual acuity change after intravitreal bevacizumab for exudative age-related macular degeneration in relation to subfoveal membrane type». En: *Acta Ophthalmol Scand* 85.5, págs. 563-565.
- Jong, O. G. de, Verhaar, M. C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., Schiffelers, R. M., Gucsek, M. y Balkom, B. W. van (2012). «Cellular stress conditions are reflected

- in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes». En: *J Extracell Vesicles* 1.
- Jung, J. J., Chen, C. Y., Mrejen, S., Gallego-Pinazo, R., Xu, L., Marsiglia, M., Boddu, S. y Freund, K. B. (2014). «The incidence of neovascular subtypes in newly diagnosed neovascular age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 158.4, págs. 769-779.
- Kaiser, P. K., Brown, D. M., Zhang, K., Hudson, H. L., Holz, F. G., Shapiro, H., Schneider, S. y Acharya, N. R. (2007). «Ranibizumab for predominantly classic neovascular age-related macular degeneration: subgroup analysis of first-year ANCHOR results». En: *Am. J. Ophthalmol.* 144.6, págs. 850-857.
- Kanagasingam, Y., Bhuiyan, A., Abramoff, M. D., Smith, R. T., Goldschmidt, L. y Wong, T. Y. (2014). «Progress on retinal image analysis for age related macular degeneration». En: *Prog Retin Eye Res* 38, págs. 20-42.
- Kaneko, H. et al. (2011). «DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration». En: *Nature* 471.7338, págs. 325-330.
- Kang, G. Y., Bang, J. Y., Choi, A. J., Yoon, J., Lee, W. C., Choi, S., Yoon, S., Kim, H. C., Baek, J. H., Park, H. S., Lim, H. J. y Chung, H. (2014a). «Exosomal proteins in the aqueous humor as novel biomarkers in patients with neovascular age-related macular degeneration». En: *J. Proteome Res.* 13.2, págs. 581-595.
- Kang, H. M., Kwon, H. J., Yi, J. H., Lee, C. S. y Lee, S. C. (2014b). «Subfoveal choroidal thickness as a potential predictor of visual outcome and treatment response after intravitreal ranibizumab injections for typical exudative age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 157.5, págs. 1013-1021.
- Kannan, R., Sreekumar, P. G. e Hinton, D. R. (2016). «Alpha crystallins in the retinal pigment epithelium and implications for the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration». En: *Biochim. Biophys. Acta* 1860.1 Pt B, págs. 258-268.
- Karimi, S., Nourinia, R. y Mashayekhi, A. (2015). «Circumscribed Choroidal Hemangioma». En: *J Ophthalmic Vis Res* 10.3, págs. 320-328.

- Kase, S., He, S., Sonoda, S., Kitamura, M., Spee, C., Wawrousek, E., Ryan, S. J., Kannan, R. e Hinton, D. R. (2010). «alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF». En: *Blood* 115.16, págs. 3398-3406.
- Kaszubski, P., Ben Ami, T., Saade, C. y Smith, R. T. (2016). «Geographic atrophy and choroidal neovascularization in the same eye: A review». En: *Ophthalmic Res.* 55.4, págs. 185-193.
- Keane, P. A., Patel, P. J., Liakopoulos, S., Heussen, F. M., Sadda, S. R. y Tufail, A. (2012). «Evaluation of age-related macular degeneration with optical coherence tomography». En: *Surv Ophthalmol* 57.5, págs. 389-414.
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L. y Mathivanan, S. (2016). «ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo». En: *J. Mol. Biol.* 428.4, págs. 688-692.
- Kellner, U., Kellner, S. y Weinitz, S. (2010). «Fundus autofluorescence (488 NM) and near-infrared autofluorescence (787 NM) visualize different retinal pigment epithelium alterations in patients with age-related macular degeneration». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 30.1, págs. 6-15.
- Khan, J. C., Shahid, H., Thurlby, D. A., Yates, J. R. y Moore, A. T. (2008). «Charles Bonnet syndrome in age-related macular degeneration: the nature and frequency of images in subjects with end-stage disease». En: *Ophthalmic Epidemiol* 15.3, págs. 202-208.
- Khan, K. N., Mahroo, O. A., Khan, R. S., Mohamed, M. D., McKibbin, M., Bird, A., Michaelides, M., Tufail, A. y Moore, A. T. (2016). «Differentiating drusen: Drusen and drusen-like appearances associated with ageing, age-related macular degeneration, inherited eye disease and other pathological processes». En: *Prog Retin Eye Res* 53, págs. 70-106.
- Khanani, A. M. (2015). «Clinical experience with fixed bimonthly aflibercept dosing in treatment-experienced patients with neovascular age-related macular degeneration». En: *Clin Ophthalmol* 9, págs. 1315-1320.
- Kikushima, W., Sakurada, Y., Sugiyama, A., Tanabe, N., Kume, A. y Iijima, H. (2016). «Factors predictive of visual outcome 1 year after intravitreal aflibercept injection for typical neovascular age-related macular degeneration». En: *J Ocul Pharmacol Ther* 32.6, págs. 376-382.

- Kim, H., Lee, S. C., Kim, S. M., Lee, J. H., Koh, H. J., Kim, S. S., Byeon, S. H., Kim, M. y Lee, C. S. (2015). «Identification of underlying causes of spontaneous submacular hemorrhage by indocyanine green angiography». En: *Ophthalmologica* 233.3-4, págs. 146-154.
- Kim, J. H., Lee, D. W., Chang, Y. S., Kim, J. W. y Kim, C. G. (2016a). «Twelve-month outcomes of treatment using ranibizumab or aflibercept for neovascular age-related macular degeneration: a comparative study». En: *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*
- Kim, J. Y., Kwon, O. W., Oh, H. S., Kim, S. H. y You, Y. S. (2016b). «Optical coherence tomography angiography in patients with polypoidal choroidal vasculopathy». En: *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 254.8, págs. 1505-1510.
- Kim, Y. M., Kim, J. H. y Koh, H. J. (2012). «Improvement of photoreceptor integrity and associated visual outcome in neovascular age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 154.1, págs. 164-173.
- Kinyoun, J. L., Martin, D. C., Fujimoto, W. Y. y Leonetti, D. L. (1992). «Ophthalmoscopy versus fundus photographs for detecting and grading diabetic retinopathy». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33.6, págs. 1888-1893.
- Kiser, P. D. y Palczewski, K. (2010). «Membrane-binding and enzymatic properties of RPE65». En: *Prog Retin Eye Res* 29.5, págs. 428-442.
- Kitchens, J. W., Do, D. V., Boyer, D. S., Thompson, D., Gibson, A., Saroj, N., Vitti, R., Berliner, A. J. y Kaiser, P. K. (2016). «Comprehensive review of ocular and systemic safety events with intravitreal aflibercept injection in randomized controlled trials». En: *Ophthalmology* 123.7, págs. 1511-1520.
- Klein, M. L., Ferris, F. L., Armstrong, J., Hwang, T. S., Chew, E. Y., Bressler, S. B. y Chandra, S. R. (2008a). «Retinal precursors and the development of geographic atrophy in age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 115.6, págs. 1026-1031.
- Klein, R., Davis, M. D., Magli, Y. L., Segal, P., Klein, B. E. y Hubbard, L. (1991). «The Wisconsin age-related maculopathy grading system». En: *Ophthalmology* 98.7, págs. 1128-1134.

- Klein, R., Klein, B. E. y Linton, K. L. (1992). «Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study». En: *Ophthalmology* 99.6, págs. 933-943.
- Klein, R., Meuer, S. M., Knudtson, M. D. y Klein, B. E. (2008b). «The epidemiology of progression of pure geographic atrophy: the Beaver Dam Eye Study». En: *Am. J. Ophthalmol.* 146.5, págs. 692-699.
- Koh, A. H., Chen, L. J., Chen, S. J., Chen, Y., Giridhar, A., Iida, T., Kim, H., Yuk Yau Lai, T., Lee, W. K., Li, X., Han Lim, T., Ruamviboonsuk, P., Sharma, T., Tang, S. y Yuzawa, M. (2013). «Polypoidal choroidal vasculopathy: evidence-based guidelines for clinical diagnosis and treatment». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 33.4, págs. 686-716.
- Koizumi, H., Kano, M., Yamamoto, A., Saito, M., Maruko, I., Sekiryu, T., Okada, A. A. y Iida, T. (2016a). «Subfoveal choroidal thickness during aflibercept therapy for eovascular age-related macular degeneration: Twelve-month results». En: *Ophthalmology* 123.3, págs. 617-624.
- Koizumi, H., Yamamoto, A., Maruko, I., Okada, A. A., Iida, T., Kano, M., Saito, M., Sekiryu, T. y Kawasaki, R. (2016b). «Short-term changes in choroidal thickness after aflibercept therapy for neovascular age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.*
- Kolb, H. (1995). «Photoreceptors». En: *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*. Ed. por H. Kolb, E. Fernandez y R. Nelso. [Disponible online en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1152>; accedido 8 Jun 2016]. Salt Lake City: Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Kolb, H., Fernandez, E., Schouten, J., Ahnelt, P., Linberg, K. A. y Fisher, S. K. (1994). «Are there three types of horizontal cell in the human retina?» En: *J. Comp. Neurol.* 343.3, págs. 370-386.
- Kong, W., He, L., Richards, E. J., Challa, S., Xu, C. X., Permut-Wey, J., Lancaster, J. M., Coppola, D., Sellers, T. A., Djeu, J. Y. y Cheng, J. Q. (2014). «Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer». En: *Oncogene* 33.6, págs. 679-689.

- Kooijmans, S. A., Vader, P., Dommelen, S. M. van, Solinge, W. W. van y Schiffelers, R. M. (2012). «Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems». En: *Int J Nanomedicine* 7, págs. 1525-1541.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K. y Ochiya, T. (2010). «microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk». En: *Silence* 1.1, pág. 7.
- Kovach, J. L., Schwartz, S. G., Flynn, H. W. y Scott, I. U. (2012). «Anti-VEGF Treatment strategies for wet AMD». En: *J Ophthalmol* 2012, pág. 786870.
- Koyama, Y., Ito, T., Hasegawa, A., Eriguchi, M., Inaba, T., Ushigusa, T. y Sugiura, K. (2016). «Exosomes derived from tumor cells genetically modified to express Mycobacterium tuberculosis antigen: a novel vaccine for cancer therapy». En: *Biotechnol. Lett.*
- Kuehlewein, L., Bansal, M., Lenis, T. L., Iafe, N. A., Sadda, S. R., Bonini Filho, M. A., De Carlo, T. E., Waheed, N. K., Duker, J. S. y Sarraf, D. (2015). «Optical coherence tomography angiography of type 1 neovascularization in age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 160.4, págs. 739-748.
- Kvanta, A., Casselholm de Salles, M., Amren, U. y Bartuma, H. (2016). «Optical coherence tomography angiography of the foveal microvasculature geographic atrophy». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)*
- Ladas, I. D., Chatziralli, I. P., Kotsolis, A. I., Douvali, M., Georgalas, I., Theodosiadis, P. G. y Rouvas, A. A. (2012). «Intravitreal ranibizumab versus thermal laser photocoagulation in the treatment of extrafoveal classic choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration». En: *Ophthalmologica* 228.2, págs. 93-101.
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., Kleijn, D. P. de y Lim, S. K. (2010). «Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury». En: *Stem Cell Res* 4.3, págs. 214-222.
- Lakkaraju, A., Toops, K. A. y Xu, J. (2014). «Should I stay or should I go? Trafficking of sublytic MAC in the retinal pigment epithelium». En: *Adv. Exp. Med. Biol.* 801, págs. 267-274.

- Lala, C., Framme, C., Wolf-Schnurrbusch, U. E. y Wolf, S. (2013). «Three-year results of visual outcome with disease activity-guided ranibizumab algorithm for the treatment of exudative age-related macular degeneration». En: *Acta Ophthalmol* 91.6, págs. 526-530.
- Lalwani, G. A., Rosenfeld, P. J., Fung, A. E., Dubovy, S. R., Michels, S., Feuer, W., Davis, J. L., Flynn, H. W. y Esquiabro, M. (2009). «A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study». En: *Am. J. Ophthalmol.* 148.1, págs. 43-58.
- Lambert, N. G., ElShelmani, H., Singh, M. K., Mansergh, F. C., Wride, M. A., Padilla, M., Keegan, D., Hogg, R. E. y Ambati, B. K. (2016). «Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration». En: *Prog Retin Eye Res.*
- Lawson, C., Vicencio, J. M., Yellon, D. M. y Davidson, S. M. (2016). «Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease». En: *J. Endocrinol.* 228.2, págs. 57-71.
- Lazzeri, S., Ripandelli, G., Sartini, M. S., Parravano, M., Varano, M., Nardi, M., Di Desidero, T., Orlandi, P. y Bocci, G. (2015). «Aflibercept administration in neovascular age-related macular degeneration refractory to previous anti-vascular endothelial growth factor drugs: a critical review and new possible approaches to move forward». En: *Angiogenesis* 18.4, págs. 397-432.
- Leblanc, P., Alais, S., Porto-Carreiro, I., Lehmann, S., Grassi, J., Raposo, G. y Darlix, J. L. (2006). «Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture». En: *EMBO J.* 25.12, págs. 2674-2685.
- Li, B., Powell, A. M., Hooper, P. L. y Sheidow, T. G. (2015). «Prospective evaluation of teleophthalmology in screening and recurrence monitoring of neovascular age-related macular degeneration: a randomized clinical trial». En: *JAMA Ophthalmol* 133.3, págs. 276-282.
- Li, X., Lee, C., Tang, Z., Zhang, F., Arjunan, P., Li, Y., Hou, X., Kumar, A. y Dong, L. (2009). «VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor?» En: *Cell Adh Migr* 3.4, págs. 322-327.

- Liew, G., Joachim, N., Mitchell, P., Burlutsky, G. y Wang, J. J. (2016). «Validating the AREDS simplified severity scale of age-related macular degeneration with 5- and 10-year incident data in a population-based sample». En: *Ophthalmology*.
- Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G. y Wong, T. Y. (2012). «Age-related macular degeneration». En: *Lancet* 379.9827, págs. 1728-1738.
- Lin, H., Qian, J., Castillo, A. C., Long, B., Keyes, K. T., Chen, G. y Ye, Y. (2011). «Effect of miR-23 on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52.9, págs. 6308-6314.
- Liu, R., Li, J., Li, Z., Yu, S., Yang, Y., Yan, H., Zeng, J., Tang, S. y Ding, X. (2016). «Distinguishing polypoidal choroidal vasculopathy from typical neovascular age-related macular degeneration based on spectral domain optical coherence tomography». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 36.4, págs. 778-786.
- Locke, C. J., Congrove, N. R., Dismuke, W. M., Bowen, T. J., Stamer, W. D. y McKay, B. S. (2014). «Controlled exosome release from the retinal pigment epithelium in situ». En: *Exp. Eye Res.* 129, págs. 1-4.
- Loewenstein, A. (2007). «The significance of early detection of age-related macular degeneration: Richard & Hinda Rosenthal Foundation lecture, The Macula Society 29th annual meeting». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 27.7, págs. 873-878.
- Lumbroso, B., Rispoli, M. y Savastano, M. C. (2015). «Longitudinal optical coherence tomography-angiography study of type 2 naive choroidal neovascularization early response after treatment». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.11, págs. 2242-2251.
- Lupidi, M., Coscas, F., Cagini, C., Fiore, T., Spaccini, E., Fruttini, D. y Coscas, G. (2016). «Automated quantitative analysis of retinal microvasculature in normal eyes on optical coherence tomography angiography». En: *Am. J. Ophthalmol.*
- MacDonald, D. A. et al. (2016). «Aflibercept exhibits VEGF binding stoichiometry distinct from bevacizumab and does not support formation of immune-like complexes». En: *Angiogenesis* 19.3, págs. 389-406.

- Maguire, M. G., Martin, D. F., Ying, G. S., Jaffe, G. J., Daniel, E., Grunwald, J. E., Toth, C. A., Ferris, F. L. y Fine, S. L. (2016). «Five-year outcomes with anti-vascular endothelial growth factor treatment of neovascular age-related macular degeneration: The comparison of age-related macular degeneration treatments trials». En: *Ophthalmology* 123.8, págs. 1751-1761.
- Major, J. C., Wykoff, C. C., Croft, D. E., Wang, R., Mariani, A. F., Lehmann, A. E. y Brown, D. M. (2015). «Aflibercept for pigment epithelial detachment for previously treated neovascular age-related macular degeneration». En: *Can. J. Ophthalmol.* 50.5, págs. 373-377.
- Mangione, C. M., Lee, P. P., Gutierrez, P. R., Spritzer, K., Berry, S. y Hays, R. D. (2001). «Development of the 25-item National Eye Institute Visual Function Questionnaire». En: *Arch. Ophthalmol.* 119.7, págs. 1050-1058.
- Mantel, I., Niderprim, S. A., Gianniou, C., Deli, A. y Ambresin, A. (2014). «Reducing the clinical burden of ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration using an individually planned regimen». En: *Br J Ophthalmol* 98.9, págs. 1192-1196.
- Marques, J. P., Lains, I., Costa, M. A., Pires, I., Luz Cachulo, M. da, Figueira, J. y Silva, R. (2015). «Retinal angiomatous proliferation: A quantitative analysis of the fundoscopic features of the fellow eye». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.10, págs. 1985-1991.
- Marsiglia, M., Boddu, S., Chen, C. Y., Jung, J. J., Mrejen, S., Gallego-Pinazo, R. y Freund, K. B. (2015). «Correlation between neovascular lesion type and clinical characteristics of nonneovascular fellow eyes in patients with unilateral, neovascular age-related macular degeneration». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.5, págs. 966-974.
- Martin, D. F. et al. (2011). «Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration». En: *N. Engl. J. Med.* 364.20, págs. 1897-1908.
- Martin, D. F. et al. (2012). «Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results». En: *Ophthalmology* 119.7, págs. 1388-1398.
- Maruko, I., Iida, T., Sugano, Y., Furuta, M. y Sekiryu, T. (2011). «One-year choroidal thickness results after photodynamic therapy for central serous chorioretinopathy». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 31.9, págs. 1921-1927.

- Mathew, R., Richardson, M. y Sivaprasad, S. (2013). «Predictive value of spectral-domain optical coherence tomography features in assessment of visual prognosis in eyes with neovascular age-related macular degeneration treated with ranibizumab». En: *Am. J. Ophthalmol.* 155.4, págs. 720-726.
- McDonnell, E. C., Heussen, F. M., Ruiz-Garcia, H., Ouyang, Y., Narala, R., Walsh, A. C. y Sadda, S. R. (2014). «Effect of anti-VEGF treatment on choroidal thickness over time in patients with neovascular age-related macular degeneration». En: *Eur J Ophthalmol* 24.6, págs. 897-903.
- Michelson, G., Laser, M., Muller, S., Weber, F. y Warntges, S. (2011). «[Validation of telemedical fundus images from patients with retinopathy]». En: *Klin Monbl Augenheilkd* 228.3, págs. 234-238.
- Miki, A., Ikuno, Y., Jo, Y. y Nishida, K. (2013). «Comparison of enhanced depth imaging and high-penetration optical coherence tomography for imaging deep optic nerve head and parapapillary structures». En: *Clin Ophthalmol* 7, págs. 1995-2001.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B. y Tewari, M. (2008). «Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105.30, págs. 10513-10518.
- Mitchell, P., Smith, W., Attebo, K. y Wang, J. J. (1995). «Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study». En: *Ophthalmology* 102.10, págs. 1450-1460.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., Bernad, A. y Sanchez-Madrid, F. (2011). «Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells». En: *Nat Commun* 2, pág. 282.
- Mones, J., Biarnes, M., Trindade, F. y Casaroli-Marano, R. (2012). «FUSION regimen: ranibizumab in treatment-naïve patients with exudative age-related macular degeneration and relatively good baseline visual acuity». En: *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 250.12, págs. 1737-1744.

- Moore, D. J., Hussain, A. A. y Marshall, J. (1995). «Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36.7, págs. 1290-1297.
- Mrejen, S., Jung, J. J., Chen, C., Patel, S. N., Gallego-Pinazo, R., Yannuzzi, N., Xu, L., Marsiglia, M., Boddu, S. y Freund, K. B. (2015). «Long-term visual outcomes for a treat and extend anti-vascular endothelial growth factor regimen in eyes with neovascular age-related macular degeneration». En: *J Clin Med* 4.7, págs. 1380-1402.
- Mrejen, S., Sarraf, D., Mukkamala, S. K. y Freund, K. B. (2013). «Multimodal imaging of pigment epithelial detachment: a guide to evaluation». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 33.9, págs. 1735-1762.
- Muftuoglu, I. K., Arcinue, C. A., Tsai, F. F., Alam, M., Gaber, R., Camacho, N., You, Q. y Freeman, W. R. (2016). «Long-term results of pro re nata regimen of aflibercept treatment in persistent neovascular age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 167, págs. 1-9.
- Murthy, R. K., Haji, S., Sambhav, K., Grover, S. y Chalam, K. V. (2016). «Clinical applications of spectral domain optical coherence tomography in retinal diseases». En: *Biomed J* 39.2, págs. 107-120.
- Nagiel, A., Sarraf, D., Sadda, S. R., Spaide, R. F., Jung, J. J., Bhavsar, K. V., Ameri, H., Querques, G. y Freund, K. B. (2015). «Type 3 neovascularization: evolution, association with pigment epithelial detachment, and treatment response as revealed by spectral domain optical coherence tomography». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.4, págs. 638-647.
- Naysan, J., Jung, J. J., Dansingani, K. K., Balaratnasingam, C. y Freund, K. B. (2016). «Type 2 subretinal neovascularization in age-related macular degeneration associated with pure reticular pseudodrusen phenotype». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 36.3, págs. 449-457.
- Ni, J. et al. (2009). «Plasma protein pentosidine and carboxymethyllysine, biomarkers for age-related macular degeneration». En: *Mol. Cell Proteomics* 8.8, págs. 1921-1933.
- Nielsen, N. V. (1986). «The normal fundus fluorescein angiogram and the normal fundus photograph. An analysis of fundus fluorescein angiography, colour and filter photography of

- the posterior pole of the eye in clinically healthy subjects and in diabetics without obvious lesions ophthalmoscopically». En: *Acta Ophthalmol Suppl* 180, págs. 1-30.
- Nieuwenhuysen, P. y Clauwaert, J. (1978). «Physical properties of *Artemia salina* ribosomes». En: *Biochemistry* 17.20, págs. 4260-4265.
- Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X. O. y Widmark, A. (2009). «Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer». En: *Br. J. Cancer* 100.10, págs. 1603-1607.
- Ohnaka, M., Nagai, Y., Sho, K., Miki, K., Kimura, M., Chihara, T. y Takahashi, K. (2016). «A modified treat-and-extend regimen of aflibercept for treatment-naïve patients with neovascular age-related macular degeneration». En: *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*
- Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., Gotoh, N. y Kuroda, M. (2013). «Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells». En: *Mol. Ther.* 21.1, págs. 185-191.
- Oishi, A., Hata, M., Shimozone, M., Mandai, M., Nishida, A. y Kurimoto, Y. (2010). «The significance of external limiting membrane status for visual acuity in age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 150.1, págs. 27-32.
- Oishi, A., Shimozone, M., Mandai, M., Hata, M., Nishida, A. y Kurimoto, Y. (2013). «Recovery of photoreceptor outer segments after anti-VEGF therapy for age-related macular degeneration». En: *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 251.2, págs. 435-440.
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. y Claesson-Welsh, L. (2006). «VEGF receptor signalling - in control of vascular function». En: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7.5, págs. 359-371.
- Ooto, S., Vongkulsiri, S., Sato, T., Suzuki, M., Curcio, C. A. y Spaide, R. F. (2014). «Outer retinal corrugations in age-related macular degeneration». En: *JAMA Ophthalmol* 132.7, págs. 806-813.

- Owsley, C., Jackson, G. R., White, M., Feist, R. y Edwards, D. (2001). «Delays in rod-mediated dark adaptation in early age-related maculopathy». En: *Ophthalmology* 108.7, págs. 1196-1202.
- Ozkok, A., Sigford, D. K. y Tezel, T. H. (2016). «Patterns of fundus autofluorescence defects in neovascular age-related macular degeneration subtypes.» En: *Retina (Philadelphia, Pa.)*
- Palejwala, N. V., Jia, Y., Gao, S. S., Liu, L., Flaxel, C. J., Hwang, T. S., Lauer, A. K., Wilson, D. J., Huang, D. y Bailey, S. T. (2015). «Detection of nonexudative choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with optical coherence tomography angiography». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.11, págs. 2204-2211.
- Panda-Jonas, S., Jonas, J. B. y Jakobczyk-Zmija, M. (1996). «Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes». En: *Am. J. Ophthalmol.* 121.2, págs. 181-189.
- Pang, C. E., Messinger, J. D., Zanzottera, E. C., Freund, K. B. y Curcio, C. A. (2015). «The onionsign in neovascular age-related macular degeneration represents cholesterol crystals». En: *Ophthalmology* 122.11, págs. 2316-2326.
- Papadopoulos, N., Martin, J., Ruan, Q., Rafique, A., Rosconi, M. P., Shi, E., Pyles, E. A., Yancopoulos, G. D., Stahl, N. y Wiegand, S. J. (2012). «Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab». En: *Angiogenesis* 15.2, págs. 171-185.
- Papavasileiou, E., Zygoura, V., Richardson, T., Cortis, D., Eleftheriadis, H. y Jackson, T. L. (2015). «Intravitreal aflibercept (A-IVI) for the treatment of neovascular age-related macular degeneration (nv-AMD): one year experience». En: *Hell J Nucl Med* 18 Suppl 1, págs. 29-32.
- Pardridge, W. M. (2012). «Drug transport across the blood-brain barrier». En: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32.11, págs. 1959-1972.
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M. y Fais, S. (2009).

- «Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells». En: *J. Biol. Chem.* 284.49, págs. 34211-34222.
- Patton, N., Aslam, T. M., MacGillivray, T., Deary, I. J., Dhillon, B., Eikelboom, R. H., Yogesan, K. y Constable, I. J. (2006). «Retinal image analysis: concepts, applications and potential». En: *Prog Retin Eye Res* 25.1, págs. 99-127.
- Paun, C. C., Ersoy, L., Schick, T., Groenewoud, J. M., Lechanteur, Y. T., Fauser, S., Hoyng, C. B., Jong, E. K. de y Hollander, A. I. den (2015). «Genetic variants and systemic complement activation levels are associated with serum lipoprotein levels in age-related macular degeneration». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56.13, págs. 7766-7773.
- Pegtel, D. M., Garde, M. D. van de y Middeldorp, J. M. (2011). «Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion». En: *Biochim. Biophys. Acta* 1809.11-12, págs. 715-721.
- Pelosini, L., Hull, C. C., Boyce, J. F., McHugh, D., Stanford, M. R. y Marshall, J. (2011). «Optical coherence tomography may be used to predict visual acuity in patients with macular edema». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52.5, págs. 2741-2748.
- Phan, T. V., Seoud, L., Chakor, H. y Cheriet, F. (2016). «Automatic screening and grading of age-related macular degeneration from texture analysis of fundus images». En: *J Ophthalmol* 2016, pág. 5893601.
- Phipps, J. A., Guymer, R. H. y Vingrys, A. J. (2003). «Loss of cone function in age-related maculopathy». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44.5, págs. 2277-2283.
- Pinheiro-Costa, J., Costa, J. M., Beato, J. N., Freitas-da-Costa, P., Brandao, E., Falcao, M. S., Falcao-Reis, F. y Carneiro, A. M. (2015). «Switch to aflibercept in the treatment of neovascular AMD: One-year results in clinical Practice». En: *Ophthalmologica* 233.3-4, págs. 155-161.
- Pinna, A., Zinellu, A., Tendas, D., Blasetti, F., Carru, C. y Castiglia, P. (2016). «Plasma homocysteine and asymmetrical dimethyl-l-arginine (ADMA) and whole blood DNA methylation in early and neovascular age-related macular degeneration: A pilot study». En: *Curr. Eye Res.* 41.1, págs. 88-96.

- 
- Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., Mercatanti, A., Hammond, S. y Rainaldi, G. (2006). «MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs». En: *Blood* 108.9, págs. 3068-3071.
- Provis, J. M. (2001). «Development of the primate retinal vasculature». En: *Prog Retin Eye Res* 20.6, págs. 799-821.
- Provis, J. M., Dubis, A. M., Maddess, T. y Carroll, J. (2013). «Adaptation of the central retina for high acuity vision: cones, the fovea and the avascular zone». En: *Prog Retin Eye Res* 35, págs. 63-81.
- Provis, J. M., Penfold, P. L., Cornish, E. E., Sandercoe, T. M. y Madigan, M. C. (2005). «Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration». En: *Clin Exp Optom* 88.5, págs. 269-281.
- Pusic, A. D., Pusic, K. M., Clayton, B. L. y Kraig, R. P. (2014). «IFN $\gamma$ -stimulated dendritic cell exosomes as a potential therapeutic for remyelination». En: *J. Neuroimmunol.* 266.1-2, págs. 12-23.
- Qian, X., Xu, C., Fang, S., Zhao, P., Wang, Y., Liu, H., Yuan, W. y Qi, Z. (2016). «Exosomal MicroRNAs derived from umbilical mesenchymal stem cells inhibit hepatitis C virus infection». En: *Stem Cells Transl Med.*
- Querques, G., Capuano, V., Costanzo, E., Corvi, F., Querques, L., Introini, U., Souied, E. H. y Bandello, F. (2016). «Retinal pigment epithelium aperture: A previously unreported finding in the evolution of a vascular pigment epithelium detachment». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)*
- Querques, G., Souied, E. H. y Freund, K. B. (2013). «Multimodal imaging of early stage 1 type 3 neovascularization with simultaneous eye-tracked spectral-domain optical coherence tomography and high-speed real-time angiography». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 33.9, págs. 1881-1887.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D. y Zoller, M. (2012). «Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection». En: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44.9, págs. 1574-1584.
-

- Rasmussen, A., Bloch, S. B., Fuchs, J., Hansen, L. H., Larsen, M., Lacour, M., Lund-Andersen, H. y Sander, B. (2013). «A 4-year longitudinal study of 555 patients treated with ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 120.12, págs. 2630-2636.
- Rasmussen, A., Sander, B., Larsen, M., Brandi, S., Fuchs, J., Hansen, L. H. y Lund-Andersen, H. (2016). «Neovascular age-related macular degeneration treated with ranibizumab or aflibercept in the same large clinical setting: visual outcome and number of injections». En: *Acta Ophthalmol.*
- Rastogi, N. y Smith, R. T. (2016). «Association of age-related macular degeneration and reticular macular disease with cardiovascular disease». En: *Surv Ophthalmol* 61.4, págs. 422-433.
- Rayess, N., Houston, S. K., Gupta, O. P., Ho, A. C. y Regillo, C. D. (2015). «Treatment outcomes after 3 years in neovascular age-related macular degeneration using a treat-and-extend regimen». En: *Am. J. Ophthalmol.* 159.1, págs. 3-8.
- Regillo, C. D., Brown, D. M., Abraham, P., Yue, H., Ianchulev, T., Schneider, S. y Shams, N. (2008). «Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER Study year 1». En: *Am. J. Ophthalmol.* 145.2, págs. 239-248.
- Reibaldi, M., Longo, A., Pulvirenti, A., Avitabile, T., Russo, A., Cillino, S., Mariotti, C. y Casuccio, A. (2016). «Geo-epidemiology of age-related macular degeneration: New clues into the pathogenesis». En: *Am. J. Ophthalmol.* 161, págs. 78-93.
- Ricci, F., Parravano, M., Regine, F., Sciamanna, M., Tedeschi, M., Missiroli, F. y Varano, M. (2016). «Aflibercept in persistent neovascular AMD: comparison of different treatment strategies in switching therapy». En: *Eye (Lond)* 30.8, págs. 1077-1083.
- Roald, A. B., Aass, H. C. y Moe, M. C. (2015). «Recovery of plasma vascular endothelial growth factor concentrations during aflibercept loading phase and after the transition to bimonthly treatment for neovascular age-related macular degeneration». En: *Br J Ophthalmol* 99.12, págs. 1610-1613.

- Rofagha, S., Bhisitkul, R. B., Boyer, D. S., Sadda, S. R. y Zhang, K. (2013). «Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP)». En: *Ophthalmology* 120.11, págs. 2292-2299.
- Rosenfeld, P. J., Brown, D. M., Heier, J. S., Boyer, D. S., Kaiser, P. K., Chung, C. Y. y Kim, R. Y. (2006). «Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration». En: *N. Engl. J. Med.* 355.14, págs. 1419-1431.
- Rubio, R. G. y Adamis, A. P. (2016). «Ocular angiogenesis: Vascular endothelial growth factor and other factors». En: *Dev Ophthalmol* 55, págs. 28-37.
- Ryu, C. L., Al-Humaid, S., Rampakakis, E., Galic, I. J. y Chen, J. C. (2016). «Correlation of visual acuity with fibrotic scar location in treated neovascular age-related macular degeneration eyes». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 36.7, págs. 1324-1330.
- Sadiq, M. A., Hanout, M., Sarwar, S., Hassan, M., Agarwal, A., Sepah, Y. J., Do, D. V. y Nguyen, Q. D. (2016). «Platelet-derived growth factor inhibitors: A potential therapeutic approach for ocular neovascularization». En: *Dev Ophthalmol* 55, págs. 310-316.
- Safdar, A., Saleem, A. y Tarnopolsky, M. A. (2016). «The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases». En: *Nat Rev Endocrinol* 12.9, págs. 504-517.
- Sanderson, M. P., Keller, S., Alonso, A., Riedle, S., Dempsey, P. J. y Altevogt, P. (2008). «Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion». En: *J. Cell. Biochem.* 103.6, págs. 1783-1797.
- Sarks, J. P., Sarks, S. H. y Killingsworth, M. C. (1988). «Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium». En: *Eye (Lond)* 2 ( Pt 5), págs. 552-577.
- Sarraf, D., Chan, C., Rahimy, E. y Abraham, P. (2013). «Prospective evaluation of the incidence and risk factors for the development of RPE tears after high- and low-dose ranibizumab therapy». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 33.8, págs. 1551-1557.
- Sayegh, R. G., Kiss, C. G., Simader, C., Kroisamer, J., Montuoro, A., Mittermuller, T. J., Azhary, M., Bolz, M., Kreil, D. P. y Schmidt-Erfurth, U. (2014). «A systematic corre-

- lation of morphology and function using spectral domain optical coherence tomography and microperimetry in patients with geographic atrophy». En: *Br J Ophthalmol* 98.8, págs. 1050-1055.
- Schatz, H. y McDonald, H. R. (1989). «Atrophic macular degeneration. Rate of spread of geographic atrophy and visual loss». En: *Ophthalmology* 96.10, págs. 1541-1551.
- Schmidt-Erfurth, U., Chong, V., Loewenstein, A., Larsen, M., Souied, E., Schlingemann, R., Eldem, B., Mones, J., Richard, G. y Bandello, F. (2014a). «Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA)». En: *Br J Ophthalmol* 98.9, págs. 1144-1167.
- Schmidt-Erfurth, U. y Waldstein, S. M. (2016). «A paradigm shift in imaging biomarkers in neovascular age-related macular degeneration». En: *Prog Retin Eye Res* 50, págs. 1-24.
- Schmidt-Erfurth, U., Waldstein, S. M., Deak, G. G., Kundi, M. y Simader, C. (2015). «Pigment epithelial detachment followed by retinal cystoid degeneration leads to vision loss in treatment of neovascular age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 122.4, págs. 822-832.
- Schmidt-Erfurth, U. et al. (2014b). «Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies». En: *Ophthalmology* 121.1, págs. 193-201.
- Schmitz-Valckenberg, S., Holz, F. G., Bird, A. C. y Spaide, R. F. (2008). «Fundus autofluorescence imaging: review and perspectives». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 28.3, págs. 385-409.
- Scholl, H. P., Dandekar, S. S., Peto, T., Bunce, C., Xing, W., Jenkins, S. y Bird, A. C. (2004). «What is lost by digitizing stereoscopic fundus color slides for macular grading in age-related maculopathy and degeneration?» En: *Ophthalmology* 111.1, págs. 125-132.
- Scott, I. U., Bressler, N. M., Bressler, S. B., Browning, D. J., Chan, C. K., Danis, R. P., Davis, M. D., Kollman, C. y Qin, H. (2008). «Agreement between clinician and reading center gradings of diabetic retinopathy severity level at baseline in a phase 2 study of intravitreal bevacizumab for diabetic macular edema». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 28.1, págs. 36-40.

- Seguin-Greenstein, S., Lightman, S. y Tomkins-Netzer, O. (2016). «A meta-analysis of studies evaluating visual and anatomical outcomes in patients with treatment resistant eovascular age-related macular degeneration following switching to treatment with aflibercept». En: *J Ophthalmol* 2016, pág. 4095852.
- Semeraro, F., Morescalchi, F., Duse, S., Parmeggiani, F., Gambicorti, E. y Costagliola, C. (2013). «Aflibercept in wet AMD: specific role and optimal use». En: *Drug Des Devel Ther* 7, págs. 711-722.
- Shin, J. Y., Kwon, K. Y. y Byeon, S. H. (2015). «Association between choroidal thickness and the response to intravitreal ranibizumab injection in age-related macular degeneration». En: *Acta Ophthalmol* 93.6, págs. 524-532.
- Shiraki, K., Moriwaki, M., Matsumoto, M., Yanagihara, N., Yasunari, T. y Miki, T. (1997). «Long-term follow-up of severe central serous chorioretinopathy using indocyanine green angiography». En: *Int Ophthalmol* 21.5, págs. 245-253.
- Sikorav, A., Semoun, O., Zweifel, S., Jung, C., Srour, M., Querques, G. y Souied, E. H. (2016). «Prevalence and quantification of geographic atrophy associated with newly diagnosed and treatment-naïve exudative age-related macular degeneration». En: *Br J Ophthalmol*.
- Singer, M. A., Awh, C. C., Sadda, S., Freeman, W. R., Antoszyk, A. N., Wong, P. y Tuomi, L. (2012). «HORIZON: an open-label extension trial of ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 119.6, págs. 1175-1183.
- Singh, A., Faber, C., Falk, M., Nissen, M. H., Hviid, T. V. y Sørensen, T. L. (2012). «Altered expression of CD46 and CD59 on leukocytes in neovascular age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 154.1, págs. 193-199.
- Sinha, D., Valapala, M., Shang, P., Hose, S., Grebe, R., Luttj, G. A., Zigler, J. S., Kaarniranta, K. y Handa, J. T. (2016). «Lysosomes: Regulators of autophagy in the retinal pigmented epithelium». En: *Exp. Eye Res.* 144, págs. 46-53.
- Skog, J., Wurdinger, T., Rijn, S. van, Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M. y Breakefield, X. O. (2008). «Glioblastoma micro-

- vesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers». En: *Nat. Cell Biol.* 10.12, págs. 1470-1476.
- Solouma, N. H., Youssef, A. B., Badr, Y. A. y Kadah, Y. M. (2002). «A new real-time retinal tracking system for image-guided laser treatment». En: *IEEE Trans Biomed Eng* 49.9, págs. 1059-1067.
- Souied, E. H., Aslam, T., Garcia-Layana, A., Holz, F. G., Leys, A., Silva, R. y Delcourt, C. (2015). «Omega-3 fatty acids and age-related macular degeneration». En: *Ophthalmic Res.* 55.2, págs. 62-69.
- Souied, E. H., El Ameen, A., Semoun, O., Miere, A., Querques, G. y Cohen, S. Y. (2016). «Optical coherence tomography angiography of type 2 neovascularization in age-related macular degeneration». En: *Dev Ophthalmol* 56, págs. 52-56.
- Spaide, R. F. y Curcio, C. A. (2011). «Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 31.8, págs. 1609-1619.
- Spaide, R. F., Koizumi, H., Pozzoni, M. C. y Pozzoni, M. C. (2008). «Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography». En: *Am. J. Ophthalmol.* 146.4, págs. 496-500.
- Spielmann, N. y Wong, D. T. (2011). «Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives». En: *Oral Dis* 17.4, págs. 345-354.
- Stamer, W. D., Hoffman, E. A., Luther, J. M., Hachey, D. L. y Schey, K. L. (2011). «Protein profile of exosomes from trabecular meshwork cells». En: *J Proteomics* 74.6, págs. 796-804.
- Stanga, P. E., Lim, J. I. y Hamilton, P. (2003). «Indocyanine green angiography in chorioretinal diseases: indications and interpretation: an evidence-based update». En: *Ophthalmology* 110.1, págs. 15-21.
- Starita, C., Hussain, A. A., Pagliarini, S. y Marshall, J. (1996). «Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease». En: *Exp. Eye Res.* 62.5, págs. 565-572.
- Stewart, M. W. y Rosenfeld, P. J. (2008). «Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap». En: *Br J Ophthalmol* 92.5, págs. 667-668.

- 
- Strauss, O. (2005). «The retinal pigment epithelium in visual function». En: *Physiol. Rev.* 85.3, págs. 845-881.
- Sun, L., Wang, X., Zhou, Y., Ho, W. Z. y Li, J. L. (2016). «Exosomes contribute to the transmission of anti-HIV activity from TLR3-activated brain microvascular endothelial cells to macrophages». En: *Antiviral Res.*
- Suzuki, M., Curcio, C. A., Mullins, R. F. y Spaide, R. F. (2015). «Refractile drusen: Clinical imaging and candidate histology». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.5, págs. 859-865.
- Takahashi, A., Ooto, S., Yamashiro, K., Oishi, A., Tamura, H., Nakanishi, H., Ueda-Arakawa, N., Tsujikawa, A. y Yoshimura, N. (2016). «Photoreceptor damage and reduction of retinal sensitivity surrounding geographic atrophy in age-related macular degeneration». En: *Am. J. Ophthalmol.* 168, págs. 260-268.
- Tan, A. C., Fleckenstein, M., Schmitz-Valckenberg, S. y Holz, F. G. (2016a). «Clinical application of multicolor imaging technology». En: *Ophthalmologica.*
- Tan, C. S., Chew, M. C., Lim, L. W. y Sadda, S. R. (2016b). «Advances in retinal imaging for diabetic retinopathy and diabetic macular edema». En: *Indian J Ophthalmol* 64.1, págs. 76-83.
- Tan, K. A., Gupta, P., Agarwal, A., Chhablani, J., Cheng, C. Y., Keane, P. A. y Agrawal, R. (2016c). «State of science: Choroidal thickness and systemic health». En: *Surv Ophthalmol.*
- Tan, L., Wu, H., Liu, Y., Zhao, M., Li, D. y Lu, Q. (2016d). «Recent advances of exosomes in immune modulation and autoimmune diseases». En: *Autoimmunity*, págs. 1-9.
- Tao, Y. y Jonas, J. B. (2010). «Intravitreal bevacizumab for exudative age-related macular degeneration: effect on different subfoveal membranes». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 30.9, págs. 1426-1431.
- Terman, B., Khandke, L., Dougher-Vermazan, M., Maglione, D., Lassam, N. J., Gospodarowicz, D., Persico, M. G., Bohlen, P. y Eisinger, M. (1994). «VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor». En: *Growth Factors* 11.3, págs. 187-195.
-

- Thalgott, V., Feucht, N., Lohmann, C. P. y Maier, M. (2016). «[Long-term results in neovascular age-related macular degeneration : Changes in visual acuity and geographic atrophy during long-standing anti-VEGF therapy]». En: *Ophthalmologe*.
- Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O. y Amigorena, S. (2002). «Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes». En: *Nat. Immunol.* 3.12, págs. 1156-1162.
- Thery, C., Ostrowski, M. y Segura, E. (2009). «Membrane vesicles as conveyors of immune responses». En: *Nat. Rev. Immunol.* 9.8, págs. 581-593.
- Thompson, R. B., Reffatto, V., Bundy, J. G., Kortvely, E., Flinn, J. M., Lanzirrotti, A., Jones, E. A., McPhail, D. S., Fearn, S., Boldt, K., Ueffing, M., Ratu, S. G., Pauleikhoff, L., Bird, A. C. y Lengyel, I. (2015). «Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112.5, págs. 1565-1570.
- Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., Wei, J. y Nie, G. (2014). «A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy». En: *Biomaterials* 35.7, págs. 2383-2390.
- Toalster, N., Russell, M. y Ng, P. (2013). «A 12-month prospective trial of inject and extend regimen for ranibizumab treatment of age-related macular degeneration». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 33.7, págs. 1351-1358.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N. y Heine, U. (1981). «Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles». En: *Biochim. Biophys. Acta* 645.1, págs. 63-70.
- Treacy, M. P., Hurst, T. P., Conway, M., Duignan, E. S., Dimitrov, B. D., Brennan, N. y Cassidy, L. (2015). «The early treatment in diabetic retinopathy study chart compared with the tumbling-E and Landolt-C». En: *Ophthalmology* 122.5, págs. 1062-1063.
- Tresguerres, JAF., Ariznavarreta, C., Cachofeiro, V., Cardinale, D., Escrich, E., Gil Loyzaga, P., Lahera Juliá, V., Mora Teruel, F., Romano Pardo, M. y Tamargo Menéndez, J. (2005). *Fisiología Humana*. 3.<sup>a</sup> ed. Vol. 1. Madrid: Mc Graw Hill. ISBN: 8448606477.

- Udaondo, P., Salom, D., Garcia-Delpech, S. y Cisneros-Lanuza, A. (2016). «Aflibercept as first-line therapy in patients with treatment-naïve neovascular age-related macular degeneration: Prospective case series analysis in real-life clinical practice». En: *Ophthalmologica* 236.1, págs. 29-35.
- Urbich, C., Kuehbacher, A. y Dimmeler, S. (2008). «Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis». En: *Cardiovasc. Res.* 79.4, págs. 581-588.
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Madrid, F. y Mittelbrunn, M. (2014). «Sorting it out: regulation of exosome loading». En: *Semin. Cancer Biol.* 28, págs. 3-13.
- Vingerling, J. R., Klaver, C. C., Hofman, A. y Jong, P. T. de (1995). «Epidemiology of age-related maculopathy». En: *Epidemiol Rev* 17.2, págs. 347-360.
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R. y Conrad, R. (2012). «Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials». En: *Biochim. Biophys. Acta* 1820.7, págs. 940-948.
- Vogt, S. D., Curcio, C. A., Wang, L., Li, C. M., McGwin, G., Medeiros, N. E., Philp, N. J., Kimble, J. A. y Read, R. W. (2011). «Retinal pigment epithelial expression of complement regulator CD46 is altered early in the course of geographic atrophy». En: *Exp. Eye Res.* 93.4, págs. 413-423.
- Waldstein, S. M., Faatz, H., Szimacsek, M., Glodan, A. M., Podkowinski, D., Montuoro, A., Simader, C., Gerendas, B. S. y Schmidt-Erfurth, U. (2015). «Comparison of penetration depth in choroidal imaging using swept source vs spectral domain optical coherence tomography». En: *Eye (Lond)* 29.3, págs. 409-415.
- Wang, A. L., Lukas, T. J., Yuan, M., Du, N., Tso, M. O. y Neufeld, A. H. (2009). «Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration». En: *PLoS ONE* 4.1, e4160.
- Wang, H. y Hartnett, M. E. (2016a). «Regulation of signaling events involved in the pathophysiology of neovascular AMD». En: *Mol. Vis.* 22, págs. 189-202.

- Wang, M., Zhou, Y., Gao, S. S., Liu, W., Huang, Y., Huang, D. y Jia, Y. (2016b). «Evaluating polypoidal choroidal vasculopathy with optical coherence tomography angiography». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57.9, T526-532.
- Wei, W. B., Xu, L., Jonas, J. B., Shao, L., Du, K. F., Wang, S., Chen, C. X., Xu, J., Wang, Y. X., Zhou, J. Q. y You, Q. S. (2013). «Subfoveal choroidal thickness: the Beijing Eye Study». En: *Ophthalmology* 120.1, págs. 175-180.
- Wolfe, D. R. (1986). «Fluorescein angiography basic science and engineering». En: *Ophthalmology* 93.12, págs. 1617-1620.
- Wong, C. W., Yanagi, Y., Lee, W. K., Ogura, Y., Yeo, I., Wong, T. Y. y Cheung, C. M. (2016). «Age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Asians». En: *Prog Retin Eye Res* 53, págs. 107-139.
- Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M., Klein, R., Cheng, C. Y. y Wong, T. Y. (2014). «Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis». En: *Lancet Glob Health* 2.2, e106-116.
- Wykoff, C. C. et al. (2015). «Prospective trial of treat-and-extend versus monthly dosing for neovascular age-related macular degeneration: TREX-AMD 1-year results». En: *Ophthalmology* 122.12, págs. 2514-2522.
- Xu, L., Mrejen, S., Jung, J. J., Gallego-Pinazo, R., Thompson, D., Marsiglia, M. y Freund, K. B. (2015a). «Geographic atrophy in patients receiving anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35.2, págs. 176-186.
- Xu, Q., Bai, Y., Huang, L., Zhou, P., Yu, W. y Zhao, M. (2015b). «Knockout of  $\hat{I}\pm A$ -crystallin inhibits ocular neovascularization». En: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56.2, págs. 816-826.
- Yamazaki, T., Koizumi, H., Yamagishi, T. y Kinoshita, S. (2012). «Subfoveal choroidal thickness after ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration: 12-month results». En: *Ophthalmology* 119.8, págs. 1621-1627.

- Yannuzzi, L. A., Negrao, S., Iida, T., Carvalho, C., Rodriguez-Coleman, H., Slakter, J., Freund, K. B., Sorenson, J., Orlock, D. y Borodoker, N. (2001). «Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 21.5, págs. 416-434.
- Yoon, C., Kim, J., Park, G., Kim, S., Kim, D., Hur, D. Y., Kim, B. y Kim, Y. S. (2016). «Delivery of miR-155 to retinal pigment epithelial cells mediated by Burkitt's lymphoma exosomes». En: *Tumour Biol.* 37.1, págs. 313-321.
- Young, M., Chui, L., Fallah, N., Or, C., Merkur, A. B., Kirker, A. W., Albiani, D. A. y Forooghian, F. (2014). «Exacerbation of choroidal and retinal pigment epithelial atrophy after anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular age-related macular degeneration». En: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 34.7, págs. 1308-1315.
- Yu, P. K., Balaratnasingam, C., Xu, J., Morgan, W. H., Mammo, Z., Han, S., Mackenzie, P., Merkur, A., Kirker, A., Albiani, D., Sarunic, M. V. y Yu, D. Y. (2015). «Label-free density measurements of radial peripapillary capillaries in the human retina». En: *PLoS ONE* 10.8, e0135151.
- Zhang, A., Zhang, Q., Chen, C. L. y Wang, R. K. (2015). «Methods and algorithms for optical coherence tomography-based angiography: a review and comparison». En: *J Biomed Opt* 20.10, pág. 100901.
- Zhang, W., Nicholas, P., Schuman, S. G., Allingham, M. J., Faridi, A., Suthar, T., Cousins, S. W. y Prakalapakorn, S. G. (2016). «Screening for diabetic retinopathy using a portable, noncontact, nonmydriatic handheld retinal camera». En: *J Diabetes Sci Technol.*
- Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z., Kasman, I., Yao, J., Guan, Y., Oeh, J., Modrusan, Z., Bais, C., Sampath, D. y Ferrara, N. (2012). «Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway». En: *EMBO J.* 31.17, págs. 3513-3523.
- Zweifel, S. A., Engelbert, M., Laud, K., Margolis, R., Spaide, R. F. y Freund, K. B. (2009). «Outer retinal tubulation: a novel optical coherence tomography finding». En: *Arch. Ophthalmol.* 127.12, págs. 1596-1602.

Zweifel, S. A., Imamura, Y., Spaide, T. C., Fujiwara, T. y Spaide, R. F. (2010). «Prevalence and significance of subretinal drusenoid deposits (reticular pseudodrusen) in age-related macular degeneration». En: *Ophthalmology* 117.9, págs. 1775-1781.

Zwicker, J. I., Liebman, H. A., Neuberger, D., Lacroix, R., Bauer, K. A., Furie, B. C. y Furie, B. (2009). «Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy». En: *Clin. Cancer Res.* 15.22, págs. 6830-6840.