

**Universidad Cardenal Herrera-CEU**

**Departamento de Medicina y Cirugía**



**ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD Y  
MECANISMO DE ACCIÓN DE LA  
SOMATULINA AUTOGEL® PARA EL  
TRATAMIENTO DEL EDEMA MACULAR  
DIABÉTICO PERSISTENTE**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:  
Ester Fernández López

Dirigida por:  
Amparo Navea Tejerina  
Elena Palacios Pozo  
Francisco Bosch Morell

VALENCIA  
2015

LOMO

TESIS DOCTORAL

ESTER FERNÁNDEZ

LÓPEZ

2015



AGRADECIMIENTOS

*La realización de esta tesis no habría sido posible sin el trabajo y apoyo de toda una serie de personas.*

*En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis. A Amparo Navea por su motivación para iniciar este proyecto y su apoyo tanto a lo largo de todo el proceso de la tesis como durante mi formación en FISABIO Oftalmología Médica. A Elena Palacios por su orientación a la hora de organizar el trabajo, su estímulo constante y el tiempo dedicado. A Francisco Bosch por sus buenos consejos y aportación en el remate final y por su apoyo en el CEU.*

*A las investigadoras Emma Arnal y Siv Jhonsen por su dedicación y ayuda, haciendo factible la parte experimental. A Juan Luis Gómez por su contribución y profesionalidad en el estudio estadístico. Al equipo de retina de FISABIO Oftalmología Médica (Mari Carmen Desco, Jorge Mataix, Elena Palacios y Amparo Navea) por su apoyo con la parte clínica y el inolvidable comienzo de esta tesis, una tarde cualquiera entre bocatas y papeles en la FOM.*

*A todos los demás componentes de FISABIO Oftalmología Médica, por haber sido mis mentores en mis inicios en el mundo oftalmológico e inculcarme la pasión por esta especialidad, pero además por enriquecer tanto el día a día a nivel personal y hacer la jornada laboral tan amena.*

*A Adriana Fandiño, compañera de fatigas en el proceso de la tesis, por sus buenos consejos como residente mayor a lo largo de la residencia, pero más sobretodo por todos los grandes momentos compartidos como amiga.*

*A mis padres, por haber sido siempre un ejemplo a seguir de trabajo, esfuerzo y dedicación y su respaldo constante a cualquier hora y a cualquier distancia. Al resto de mi familia y amigos por todos los buenos instantes juntos y risas compartidas.*

*A Manuel, compañero de vida inmejorable, por su paciencia, por sus ánimos y buenos consejos y por ser mi mayor motor en el día a día.*

*Gracias a todos*

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
1 RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	5
1.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA .....	5
1.2 FACTORES DE RIESGO.....	6
1.3 FISIOPATOLOGÍA .....	7
1.4 NEOVASCULARIZACIÓN RETINIANA Y FACTORES ANGIOGÉNICOS .....	11
1.5 CLASIFICACIÓN DE LA RD Y EMD .....	13
1.6 SIGNOS CLÍNICOS.....	17
1.7 DIAGNÓSTICO.....	20
1.8 TRATAMIENTO.....	21
2 ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS.....	37
2.1 FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	37
2.2 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	40
2.3 APOPTOSIS .....	43
2.4 MARCADORES DE APOPTOSIS Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	45
3 SOMATOSTATINA .....	46
3.1 RELACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO CON LA RD.....	46
3.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA SOMATOSTATINA.....	49
3.3 APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS ANÁLOGOS DE LA SOMATOSTATINA EN OFTALMOLOGÍA .....	54
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	56
1 HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	57
2 OBJETIVOS .....	57
MATERIAL Y MÉTODOS .....	59
1 ESTUDIO EXPERIMENTAL .....	60
1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL .....	60
1.2 CULTIVOS CELULARES.....	60
1.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO .....	65
1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	69
2 ESTUDIO CLÍNICO .....	70
2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	70
2.2 ENTORNO Y MATERIAL UTILIZADO .....	71
2.3 MUESTRA Y SELECCIÓN DE PACIENTES .....	72
2.4 CONTROL PREINCLUSIÓN .....	73
2.5 EXPLORACIÓN OFTALMOLOGICA.....	74

2.6	OTRAS EXPLORACIONES .....	75
2.7	ADMINISTRACIÓN DE SOMATULINA AUTOGEL.....	76
2.8	CONTROL DE EFECTOS ADVERSOS .....	77
2.9	RECOGIDA DE DATOS .....	78
2.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	78
	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>79</b>
1	ESTUDIO EXPERIMENTAL .....	80
1.1	ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL VEGF POR LA SOMATULINA.....	80
1.2	ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE APOPTOSIS POR LA SOMATULINA.....	82
1.3	ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR LA SOMATULINA .....	84
1.4	CORRELACIONES.....	86
2	ESTUDIO CLÍNICO .....	88
2.1	ANÁLISIS DESCRIPTIVO .....	88
2.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	91
	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>116</b>
1	ESTUDIO EXPERIMENTAL .....	118
1.1	ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL VEGF POR LA SOMATULINA.....	118
1.2	ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE APOPTOSIS POR LA SOMATULINA.....	120
1.3	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SOMATULINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	123
1.4	RELACIÓN ENTRE VEGF, ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS.....	125
2	ESTUDIO CLÍNICO .....	127
2.1	EFFECTIVIDAD LA SOMATULINA AUTOGEL PARA EL TRATAMIENTO DEL EMD REFRACTARIO .....	129
3	LIMITACIONES DEL TRABAJO.....	137
3.1	LIMITACIONES DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL .....	137
3.2	LIMITACIONES DEL ESTUDIO CLÍNICO .....	137
4	FUTURAS LINEAS DE TRABAJO .....	137
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>138</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>140</b>
	<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>161</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>164</b>
	<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>170</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>175</b>



# INTRODUCCIÓN

# 1 RETINOPATÍA DIABÉTICA

## 1.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La **Diabetes Mellitus** (DM) es la enfermedad plurimetabólica más frecuente en humanos. La Organización mundial de la salud estima que en el mundo actualmente hay 346 millones de personas con diabetes (el 8,3% de la población mundial adulta), cifra que se duplicará para el 2030 (hasta el 9,9% de los adultos) ([www.who.int/es/](http://www.who.int/es/)).

Existen 2 tipos de diabetes, el tipo I (insulin dependiente (DMID), de aparición en menores de 30 años) que supone el 10% del total y el tipo II (no insulin dependiente (DMNID), de aparición en mayores de 30 años el 90% restante (ADA, 2006.) La incidencia de la diabetes tipo 2 podría cifrarse en torno a 60-150 casos nuevos por 100.000 habitantes y año, mientras que en la diabetes tipo 1 se acercaría a 10-12 casos por 100.000 habitantes. Esto supone, por ejemplo, que cada año en nuestro país debutarían aproximadamente 4.000 pacientes diabéticos tipo I y habría entre 24.000 y 60.000 nuevos casos de diabetes tipo II.

La diabetes consiste en un trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono ocasionado por un déficit en la secreción de insulina, en la efectividad de la misma o por un defecto en la captación celular de glucosa, lo que produce un aumento de la concentración de glucosa en sangre y tejidos intersticiales. Esto se acompaña además, de una alteración en el metabolismo lipídico y proteico.

La importancia de esta enfermedad radica en su capacidad para producir alteraciones metabólicas graves agudas como la cetoacidosis diabética o el coma hiperglucémico-hiperosmolar o complicaciones vasculares tardías debidas a la hiperglucemia crónica. Estas formas tardías pueden afectar a arterias de mediano y gran calibre (macroangiopatía), dando lugar a cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular o enfermedad vascular periférica, o afectar a vasos pequeños (microangiopatía), dañando su endotelio y produciendo retinopatía, nefropatía o neuropatía diabética. En el año 2011 según la IDF (Federación Internacional de Diabetes) la diabetes ha causado 4,6 millones de muertes, siendo la cuarta causa de muerte en la mayoría de los países en desarrollo económico y origina el 11% de los gastos totales en la sanidad pública (<http://www.idf.org/>).

La **retinopatía diabética** (RD) es por tanto una de las complicaciones microvasculares crónicas de la DM y se ha convertido en los países industrializados en la principal causa de deficiencia visual y ceguera en adultos entre los 25 y 74 años de edad (Klein R, 1984a, 1984b). Produce en promedio un 12% de nuevos casos de ceguera al año (Centers for disease control and prevention, 1996). Existen diferentes estudios de prevalencia de RD en población diabética la cual ronda entre el 20,5% del Wisconsin Epidemiologic Study of Retinopathy (WESDR) y el 39% del United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) (Pesce A, 2005).

Aproximadamente el 98% de las personas con diabetes tipo I, el 80% de los diabéticos tipo II insulin-dependientes y el 50% de los no insulin-dependientes desarrollarán RD en los primeros 20 años después

del diagnóstico de la diabetes (Farreras-Rozman, 2004). En España se encontró una prevalencia global del 25,8%, siendo el 66,7% en pacientes diagnosticados antes de los 30 años y del 23,5% en los diagnosticados después (Goldaracena MB, 1998). Otros estudios (The Blue Montains Eye Study) observan que es más frecuente la RD en pacientes adultos insulino-dependientes alcanzando el 75% frente al 35,7 % de los no insulino-dependientes (Mitchell P, 1998).

El **edema macular diabético** (EMD) es la causa principal de la pérdida de visión en los pacientes diabéticos. La prevalencia del EMD difiere en la diabetes tipo I y II y según esté tratada o no con insulina. Así según WESDR el 11,1% de los diabéticos tipo I tenían EMD, frente al 8,4% de los diabéticos tipo II. En este grupo II, un 15% de los pacientes insulino-dependientes tenían edema frente al 3,7% de los que no se trataban con insulina.

El EMD está relacionado con la severidad de la retinopatía que tiene el paciente. Estará presente en el 3% de los pacientes con RD no proliferativa leve, en el 38% si es moderada-severa y en el 71% si es proliferativa (Klein R et al., 1984). También está relacionado con la duración de la enfermedad. En el WESDR publicado en 1993 se observó como a los 10 años del diagnóstico de la DM la incidencia del EMD era de 20,1% en diabéticos tipo I, 25,4% en tipo II con insulina y 13,9% en tipo II sin insulina (Klein R et al., 1995), (siendo 8,2%, 8,4% y 2,9% respectivamente a los 4 años del diagnóstico).

## 1.2 FACTORES DE RIESGO

Se han descrito varios factores de riesgo implicados en el desarrollo de la RD, siendo los que más inciden en su prevalencia el tiempo de evolución y la edad del paciente en el momento del diagnóstico de la diabetes.

- **El tiempo de evolución de la diabetes:** La frecuencia de RD en los diabéticos tipo I a los 5 años de evolución de su enfermedad es del 23%, aumentando al 60% a los 10 años y al 80% a los 15 años. En los diabéticos tipo II se considera que ya en el momento del diagnóstico, el 18% tiene alguna forma de retinopatía (Klein R, 1995).
- **La edad en el momento del diagnóstico de la diabetes:** La RD en su forma más grave, la proliferativa (RDP), es más frecuente y se desarrolla de forma más precoz en los diabéticos de inicio juvenil que en pacientes diagnosticados posteriormente, debido probablemente a los factores hormonales relacionados con el crecimiento.
- **Mal control glucémico:** Las complicaciones de la diabetes son consecuencia directa de la hiperglucemia crónica, siendo la RD una de ellas. En el Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), se llegó a la conclusión de que todas las complicaciones microvasculares pueden

disminuir significativamente y la progresión de las mismas puede retrasarse en los pacientes que llevan un control glucémico optimizado (DCCT, 1993).

- **DM insulino dependiente (DMID):** En diferentes estudios se ha demostrado que los pacientes DMID necesitan más tiempo para desarrollar la RD, pero la desarrollan más frecuentemente. En cambio, los pacientes con DMNID la desarrollan antes pero con menor frecuencia.
- **Hipertensión arterial (HTA):** El WESDR demostró que tanto la HTA sistólica como la diastólica están relacionadas con la progresión a RDP y que la HTA diastólica está relacionada además con una mayor incidencia de EMD.
- **Dislipemia:** Varios estudios han afirmado que los niveles elevados de lípidos séricos están asociados con la RD, en concreto con la existencia de exudados duros (American Diabetes Association, 2000).
- **Embarazo:** El embarazo puede acelerar el desarrollo de la retinopatía debido entre otros factores a los cambios hormonales contrainsulares que se producen (Klein BE et al., 1990).
- **Factores oculares:** La presión intraocular, las oclusiones de ramas venosas de la retina, una cirugía de catarata complicada con rotura capsular, los traumatismos oculares, uveítis, radiación y tumores intraoculares se han encontrado relacionados con la progresión de la RD. (Demaría C, 1994)
- **Otros:** Niveles elevados de hemoglobina glicosilada, presencia de microalbuminuria, anemia severa y factores genéticos.

### 1.3 FISIOPATOLOGÍA

El desarrollo de las alteraciones microvasculares de la diabetes normalmente va precedido de al menos 5 o 10 años de hiperglucemia crónica (Lafuente ML, 2006). Esta hiperglucemia mantenida, junto al resto de factores de riesgo sistémicos mencionados previamente, van a producir una serie de cambios bioquímicos, hematológicos, anatómicos y fisiológicos, responsables del daño vascular endotelial y daño neuronal, con el consecuente desarrollo de la RD.

#### 1.3.1 CAMBIOS BIOQUÍMICOS

Los principales cambios bioquímicos inducidos por la hiperglucemia implicados en la patogenia de la RD incluyen:

#### **1.3.1.1 Acúmulo de sorbitol (vía de los polioles)**

Cuando aumenta la concentración intracelular de glucosa y se sobrepasa la capacidad de la vía glucolítica y de las pentosas, el exceso de glucosa se metaboliza a través de la vía de los polioles, convirtiéndose en sorbitol por medio de la aldosa reductasa. El incremento de sorbitol intracelular produce un incremento de la presión osmótica, favoreciendo la difusión de agua desde el espacio extracelular al interior de la célula con el consiguiente edema celular (Gabbay KH, 1975).

Por otro lado en este proceso la aldosa reductasa consume NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), lo que produce una depleción de los niveles de glutatión reducido, que es un antioxidante protector del endotelio contra los radicales libres, produciéndose así un aumento de la susceptibilidad celular al estrés oxidativo (Brownlee M, 2005a).

Ambas situaciones van a generar un **daño en el endotelio y en los pericitos**.

#### **1.3.1.2 Aumento de productos finales de la glicosilación proteica**

La hiperglucemia crónica va a dar lugar a un aumento de la producción de productos finales de la glicosilación proteica. Estos son potentes generadores de radicales libres (Brownlee M, 2001). Su aumento se ha relacionado con el engrosamiento de la membrana basal y pérdida de pericitos, con el consecuente daño endotelial y la aparición de alteraciones en la permeabilidad vascular (aumento de la viscosidad y coagulabilidad de la sangre), favoreciendo los **fenómenos microtrombóticos**.

#### **1.3.1.3 Activación de la proteinquinasa C (PKC)**

Tanto la hiperglucemia de forma directa como indirectamente a través de los productos finales de la glicosilación, como el aumento de los radicales libres, aumentan la síntesis de un cofactor crítico para la activación de las isoformas  $\beta$  y  $\gamma$  de la PKC. La activación de esta enzima aumenta la acción vasoconstrictora de la endotelina-1, disminuye la acción vasodilatadora del óxido nítrico y activa factores vasoactivos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Esto va a dar lugar a múltiples alteraciones vasculares retinianas: **aumento de la permeabilidad capilar, neovascularización retiniana, cambios en el flujo sanguíneo retiniano, oclusión capilar y disfunción endotelial** (Aiello LP, 2002; Brownlee M, 2001).

#### **1.3.1.4 Aumento de la vía de la hexosamina**

En la diabetes aumenta la vía de la hexosamina. El incremento de la actividad de esta vía se ha relacionado con la neurodegeneración retiniana, aumentando la **apoptosis neuronal**.

Todas estas vías bioquímicas implicadas en la patogénesis de la RD parecen estar conectadas entre sí. Diferentes estudios sugieren que todas ellas serían activadas por la sobreproducción de superóxido en las células endoteliales, hiperproducción que estaría inducida por la hiperglucemia.

### **1.3.2 CAMBIOS HEMATOLÓGICOS**

En la sangre se produce un estado de hipercoagulabilidad, con aumento de la viscosidad sanguínea y de la adhesividad y agregación plaquetaria. Los glóbulos rojos también son más rígidos, dañando con su roce a las células endoteliales ya de por sí deterioradas, ocasionando una alteración y obstrucción del flujo sanguíneo. También se produce un aumento de fibrinógeno plasmático. Todas estas anomalías pueden producir fenómenos trombóticos en los pequeños vasos retinianos (Lafuente M, 2005).

### **1.3.3 CAMBIOS ANATÓMICOS**

Los cambios morfológicos en la micro-arquitectura vascular incluyen:

#### **1.3.3.1 Pérdida de pericitos**

El acúmulo intracelular de sorbitol va a producir la pérdida de pericitos en los capilares de la retina, desde las fases iniciales de la RD. Los pericitos son células contráctiles de la pared capilar, con una importante función en el mantenimiento de la integridad del vaso. Su pérdida va a producir un aumento de la permeabilidad vascular y del diámetro capilar, una alteración de la regulación del tono vascular y la proliferación de células endoteliales, con la consecuente dilatación focal de la pared de los capilares, dando lugar a la formación de *microaneurismas* (Lafuente M, 2006).

#### **1.3.3.2 Engrosamiento de la membrana basal capilar**

En las fases iniciales de la RD también se produce un engrosamiento progresivo de la membrana basal capilar. Este cambio estructural ocasiona una disminución del calibre vascular y consecuentemente del flujo sanguíneo, lo que dificulta la difusión de nutrientes y favorece la *hipoxia tisular* (Lafuente M, 2006).

### **1.3.4 CAMBIOS FISIOLÓGICOS**

Todas las alteraciones bioquímicas, hematológicas y anatómicas expuestas anteriormente, condicionan una serie de cambios fisiológicos en la microcirculación:

- **Deterioro en el mecanismo de autorregulación del flujo sanguíneo**, secundario a la pérdida de pericitos y a la pérdida de elasticidad por el engrosamiento de la pared vascular. Dando lugar como consecuencia a una vasoconstricción y aumento de la resistencia del flujo.
- **Disminución de la velocidad del flujo sanguíneo**, debido a la mayor viscosidad sanguínea, degeneración de pericitos y al estrechamiento arteriolar por engrosamiento de la membrana basal.
- **Vasodilatación compensatoria** de la hipoxia retiniana.
- **Rotura de la barrera hematorretiniana (BHR) interna**, secundaria a la disminución de la proteína ocludina que forma parte de las uniones estrechas entre las células endoteliales adyacentes. Esto permite el paso de fluido y sustancias citotóxicas desde la circulación hasta el espacio intersticial, provocando edema y daño de las células retinianas.

En definitiva la microangiopatía que observamos en la RD no proliferativa (RDNP) se traduce por un lado en un aumento de la permeabilidad vascular con extravasación del contenido intravascular al espacio retiniano ocasionando edema y exudados duros (depósitos de lipoproteínas y lípidos) y por otro lado en la aparición de fenómenos de oclusión vascular que conducen a la isquemia del tejido retiniano y a la aparición de exudados blandos (microinfartos de las capas de fibras nerviosas). La hipoxia de la retina tendrá como consecuencia la formación de comunicaciones arteriovenosas y neovascularización para intentar compensar la situación de isquemia, produciéndose así un cuadro clínico aún más grave al que conocemos como RD proliferativa (RDP).

Además los desórdenes bioquímicos, hematológicos, anatómicos y fisiológicos producen de forma paralela un daño neuronal retiniano directo que contribuye a las disfunciones visuales y electrofisiológicas observadas en los pacientes diabéticos.

El siguiente esquema resume la fisiopatología de la RD:

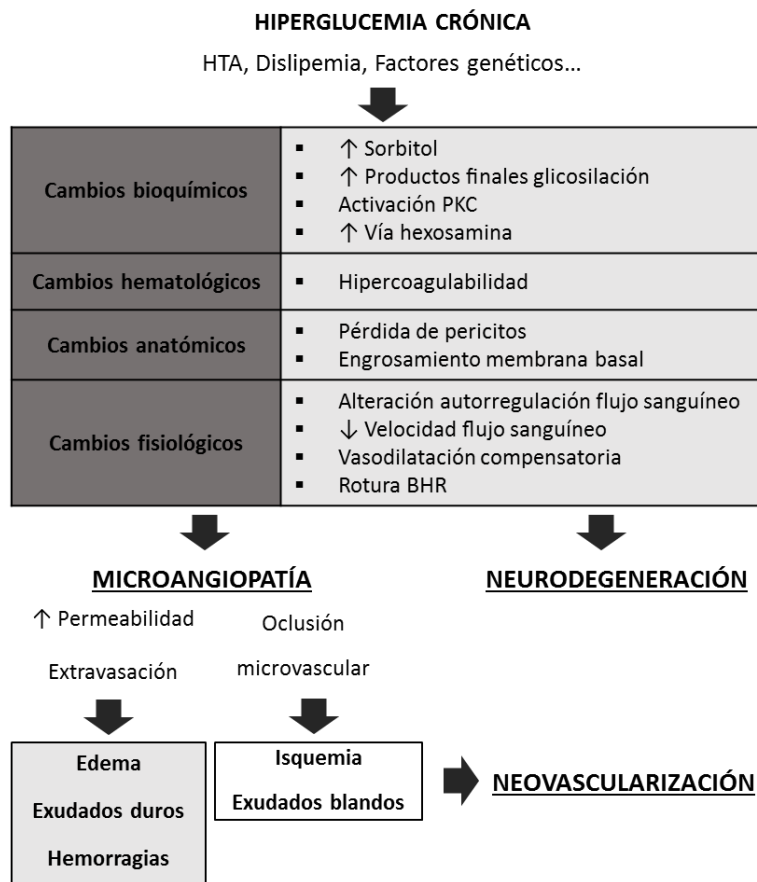


Figura 1. Representación gráfica de los diferentes cambios implicados en la fisiopatología de la RD. PKC: Proteín quinasa C; BHR: Barrera hematorretiniana.

#### 1.4 NEOVASCULARIZACIÓN RETINIANA Y FACTORES ANGIOGÉNICOS

La angiogénesis es el proceso de formación de vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Se produce cuando tenemos una hiperproducción o activación de los factores proangiogénicos o una hipoproducción o inactivación de los factores antiangiogénicos.

En la RD la situación de hipoxia retiniana estimula la expresión y secreción de factores angiogénicos, que se difunden por el tejido retiniano y actúan sobre receptores específicos situados en las células endoteliales con la consecuente formación de nuevos vasos, con el fin de intentar compensar la situación de hipoxia.

El proceso de angiogénesis involucra a una gran cantidad de mediadores que se resumen en la siguiente tabla:



FACTORES PROANGIOGÉNICOS	FACTORES ANTIANGIOGÉNICOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor)</li> <li>• FGF (Fibroblastic Growth Factor)</li> <li>• Angiopoyetina</li> <li>• IGF (Insulin Growth Factor)</li> <li>• PDGF (Platelet-derived Growth Factor)</li> <li>• HGF (Hepatocyte Growth Factor)</li> <li>• EPO (Eritropoyetina)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor)</li> <li>• TGF-<math>\beta</math> (Transforming Growth Factor)</li> <li>• Trombospondina</li> <li>• Angiostatina</li> <li>• Somatostatina (SST)</li> </ul>

Tabla 1. Resumen de los principales factores proangiogénicos y antiangiogénicos.

#### 1.4.1 FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

El VEGF es el factor del que más evidencias clínicas y experimentales existen. Es un mitógeno específico de las células endoteliales que aumenta mucho en condiciones de hipoxia. Posee una potente actividad angiogénica e inductora de la permeabilidad vascular, con lo cual estimula por un lado la formación de neovasos y por otro aumenta la permeabilidad vascular, contribuyendo a la aparición del edema. Esto ha hecho que en la actualidad se utilicen fármacos antiangiogénicos dirigidos contra el VEGF para el tratamiento del EMD o la RDP.

En la retina el VEGF es sintetizado por diferentes tipos celulares que incluyen a las células ganglionares, células del EPR, pericitos, células endoteliales, astrocitos y células de Müller. La hipoxia aumenta hasta 30 veces la producción de VEGF por estas células de la retina (Aiello LP et al., 1995). Y su efecto lo ejerce al interactuar con una familia de receptores con actividad tirosina-quinasa que se expresan en el endotelio vascular, altamente afines y específicos para el VEGF (Joukov V et al., 1996).

Varios estudios (Lu M y Adamis AP, 2002; Sarlos S et al., 2003) demuestran que el VEGF desempeña un papel importante en los procesos angiogénicos retinianos. Se ha observado en modelos experimentales de retinopatía isquémica cómo se consigue inhibir la neovascularización retiniana tras bloquear la acción del VEGF (Miller JW et al., 1997).

#### 1.4.2 FACTOR BÁSICO DE CRECIMIENTO DE LOS FIBROBLASTOS (bFGF)

Fue el primer factor de crecimiento hallado en la retina. Estimula la migración y la proliferación de células endoteliales. Tiene una acción sinérgica con el VEGF, actuando como factor potenciador en el desarrollo de la RD (Asahara T et al., 1995; Ozaki H et al., 1998).

#### 1.4.3 FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF-1)

Actúa como un factor potenciador del resto de factores. Estimula la migración y la proliferación de células endoteliales de los capilares retinianos (Grant M et al., 1986) y células del EPR (Grant MB et al., 1990).

Tanto el bFGF como el IGF juegan un papel en la neovascularización pero se piensa que no son factores angiogénicos primarios como el VEGF.

## 1.5 CLASIFICACIÓN DE LA RD Y EMD

Es esencial disponer de una clasificación de la RD que describa su severidad y la del edema macular para su correcto manejo clínico. La clasificación clínica universalmente aceptada es la formulada por el Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, conocida como ETDRS. En cada uno de sus niveles se incluyen las diferentes lesiones oftalmoscópicas y el riesgo de progresión de las mismas (Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1981; EDTRS Group, 1991). Esta clasificación se considera la de referencia para los ensayos clínicos ya que es reproducible y ampliamente validada. Sin embargo, no se utiliza habitualmente en la práctica clínica debido a su complejidad.

Para la práctica clínica diaria se utiliza la clasificación propuesta por el Global Diabetic Retinopathy Project Group (Wilkinson CP, 2003). Esta clasificación se basa en la evidencia científica proveniente de estudios previos, sobretodo el ETDRS y WESDR. Evalúa de forma independiente la RD y el EMD, basándose exclusivamente en el examen oftalmoscópico.

NIVEL DE SEVERIDAD	HALLAZGOS EN EL FONDO DE OJO
Sin retinopatía aparente	Sin alteraciones
RDNP leve	Sólo MA
RDNP moderada	MA asociados a: <ul style="list-style-type: none"><li>• &lt; 20 hemorragias intrarretinianas en cada uno de los 4 cuadrantes</li><li>• Exudados duros</li><li>• Exudados algodonosos</li><li>• Arrosamiento venoso en 1 solo cuadrante</li></ul>
RDNP severa	MA asociados a uno de los siguientes: (Regla 4-2-1) <ul style="list-style-type: none"><li>• &gt;20 hemorragias intrarretinianas en cada uno de 4 cuadrantes</li><li>• Arrosamiento venoso en 2 cuadrantes</li><li>• AMIR en 1 cuadrante</li></ul>
RDNP muy severa	MA asociados a al menos dos de los anteriores
RDP	Alguno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"><li>• Neovascularización</li><li>• Hemorragia prerretiniana o vítrea</li></ul>

Tabla 2. Clasificación clínica internacional de la RD (Wilkinson CP, 2003). RDNP: retinopatía diabética no proliferativa. RDP: retinopatía diabética proliferativa. MA: microaneurismas. AMIR: anomalías microvasculares intrarretinianas.

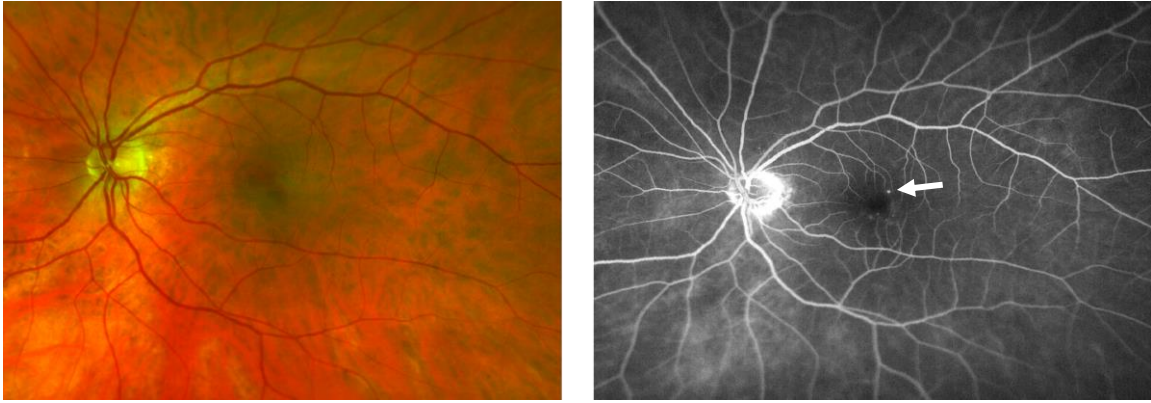


Figura 2. Fotografía y angiografía de un caso de RDNP leve, en la que únicamente se observan microaneurismas (flecha).



Figura 3. Fotografía y angiografía de un caso de RDNP moderada, con exudados duros, un exudado algodonoso y una hemorragia retiniana.

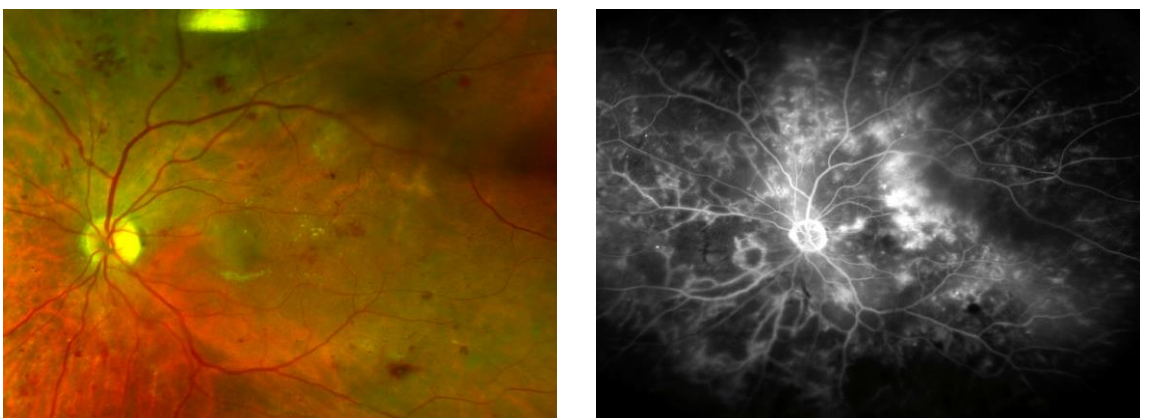


Figura 4. Fotografía y angiografía de un caso de RDNP severa con numerosas hemorragias intrarretinianas e importantes áreas de isquemia en la angiografía.

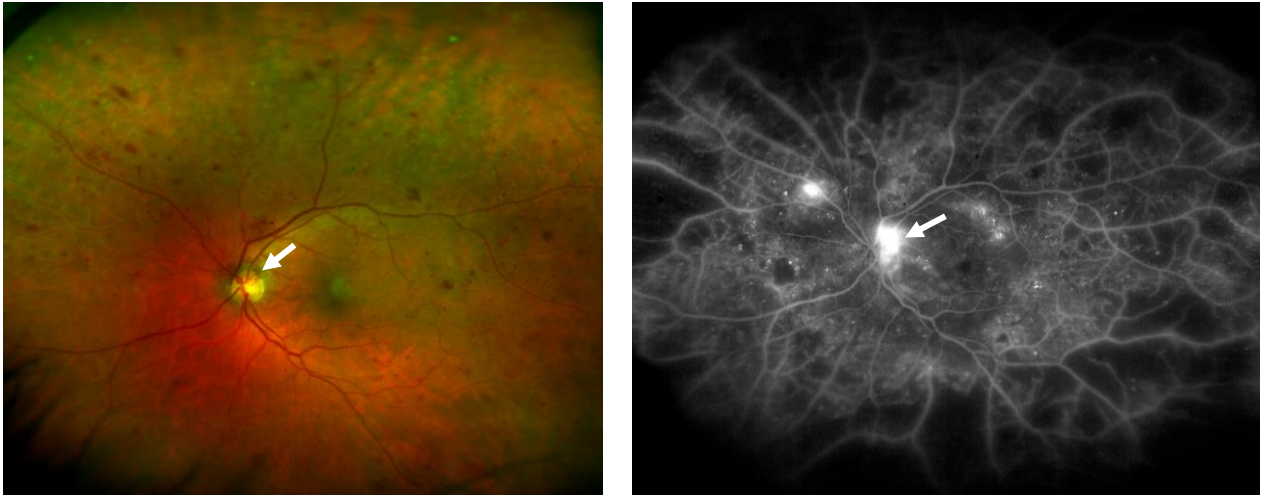


Figura 5. Fotografía y angiografía de un caso de RDP con neovasos en la papila (flecha) y abundantes áreas de isquemia en retina periférica.

NIVEL DE SEVERIDAD	HALLAZGOS EN EL FONDO DE OJO
EMD ausente	No existe aparentemente engrosamiento de la retina o exudados duros en polo posterior
EMD presente	Existe engrosamiento de la retina o exudados duros en polo posterior. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leve: lejos de la mácula</li> <li>• Moderado: cerca de la mácula sin afectación central</li> <li>• Severo: afectación del centro de la mácula</li> </ul>

Tabla 3. Clasificación Internacional del Edema Macular (Wilkinson CP, 2003). EMD: edema macular diabético.

Para el abordaje del edema macular es importante además recordar el concepto de **“edema macular clínicamente significativo (EMCS)”**, introducido por el ETDRS (ETDRS Research Group, 1985), puesto que es la indicación de elección para iniciar un tratamiento:

EDEMA MACULAR CLÍNICAMENTE SIGNIFICATIVO (Figura 6)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Engrosamiento de la retina dentro de 500 <math>\mu\text{m}^*</math> del centro de la mácula</li> <li>• Exudados duros dentro de 500 <math>\mu\text{m}</math> del centro de la mácula, si se asocia con aumento del grosor retiniano</li> <li>• Zona de engrosamiento retiniano del tamaño de al menos 1 diámetro papilar, si una parte de éste está a menos de 1 diámetro papilar del centro de la mácula.</li> </ul>

Tabla 4. EMCS (ETDRS Group, 1985)

\*Aproximadamente 1/3 del diámetro papilar

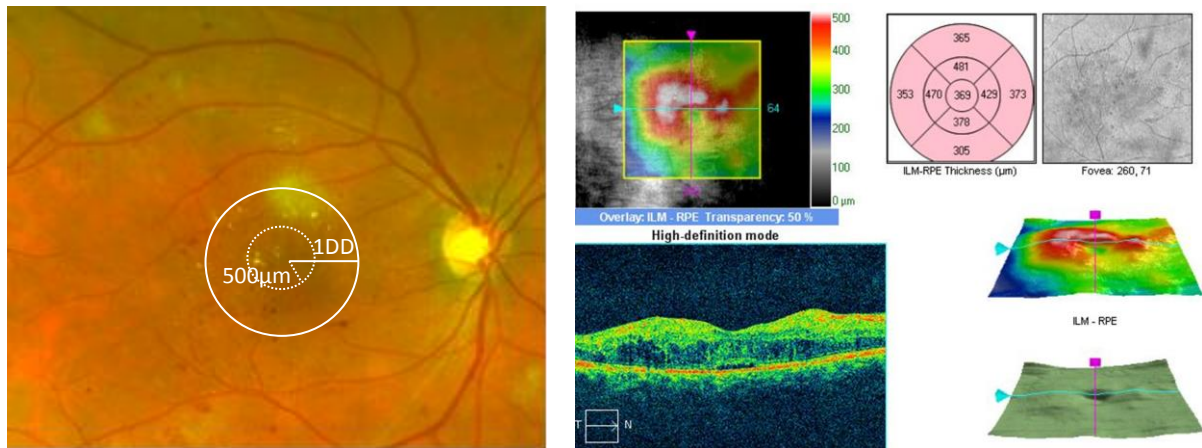


Figura 6. Fotografía e imágenes de la tomografía de coherencia óptica (OCT) de Cirrus mostrando un EMCS con engrosamiento retiniano y exudados duros dentro de las 500  $\mu\text{m}$  del centro de la mácula. DD: Diámetro de disco.

El EM puede clasificarse también en función de las áreas de fuga de contraste en la AGF (Pareja-Ríos et al., 2009) en:

- **EM focal:** Área bien definida de difusión asociada principalmente ( $\geq 67\%$ ) a microaneurismas. Fundoscópicamente se caracteriza por un anillo circinado de exudados (Figura 7a).
- **EM multifocal:** Varias áreas de difusión procedente de microaneurismas (Figura 7b).
- **EM difuso:** Área de difusión  $\geq 2\text{DD}$  o asociada  $\leq 33\%$  a microaneurismas. Fundoscópicamente aparece como un área de edema poco definida. Se asocia con frecuencia al edema macular quístico (Figura 7c).
- **EM mixto:** Coexistencia de varios tipos de EM: focal y difuso en un mismo ojo.

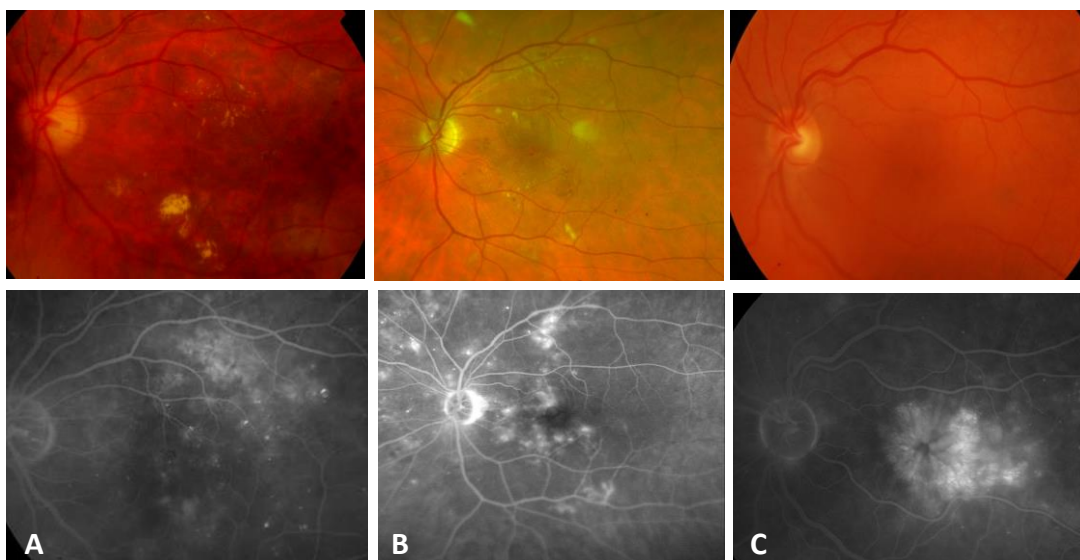


Figura 7. Imágenes fundoscópicas y angiográficas de los diferentes tipos de EM según la AGF. A) EM focal; B) EM multifocal; C) EM difuso de tipo quístico.



Actualmente debido al uso extendido de la OCT también se ha establecido una clasificación del EM basada en esta técnica (Panozzo et al., 2004):

1. *Atendiendo a la morfología:*

- **E1: EM espongiforme:** engrosamiento simple que afecta a las capas más externas de la retina, donde no se observan espacios quísticos.
- **E2: EM quístico:** engrosamiento de la retina que se asocia con quistes.
- **E3: EM con desprendimiento de neuroepitelio:** De forma aislada o asociada a alguna de las formas anteriores, puede aparecer un desprendimiento de neuroepitelio.

2. *Atendiendo a la presencia de tracción epirretiniana:*

- **T0:** Ausencia de tracción (línea hiperreflectante).
- **T1:** Presencia de línea continua hiperreflectante pero sin distorsionar la retina.
- **T2:** Línea continua hiperreflectante con múltiples puntos de unión a la retina y distorsión de la misma.
- **T3:** Tracción anteroposterior con la configuración típica en "alas de gaviota".

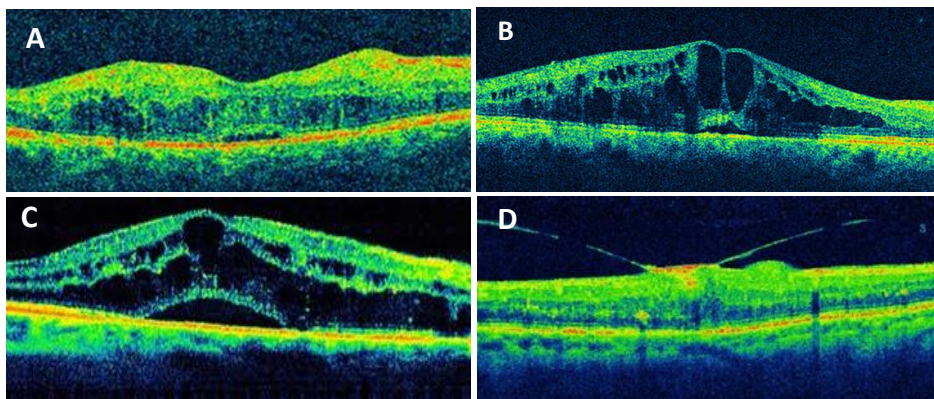


Figura 8. Imágenes de OCT que muestran diferentes tipos de EMD: A) EM espongiforme; B) EM quístico; C) EM con desprendimiento de neuroepitelio; D) EM con tracción anteroposterior.

## 1.6 SIGNOS CLÍNICOS

Según descrito anteriormente, podemos distinguir por lo tanto dos tipos fundamentales de RD:

1. **RD no proliferativa (RDNP):** Características clínicas derivadas de las alteraciones vasculares como aumento de la permeabilidad vascular y oclusión vascular.
2. **RD proliferativa (RDP):** Formación de nuevos vasos anormales y tejido fibroso, más grave y de peor pronóstico visual, aunque menos frecuente.

## **1.6.1 RETINOPATÍA DIABÉTICA NO PROLIFERATIVA**

Los hallazgos principales y característicos de la RDNP incluyen:

### **1.6.1.1 *Microaneurismas***

Los microaneurismas son dilataciones saculares de la red capilar debido a la pérdida de pericitos. Suelen ser el primer signo oftalmoscópico de la RD. Se localizan en la capa nuclear interna (Ashton N, 1950). En la oftalmoscopia se observan como pequeños puntos rojizos. En la fase inicial de la AGF se rellenan durante la fase venosa apareciendo como pequeños puntos hiperfluorescentes que pueden permitir en fases más tardías la fuga del contraste. En la RD avanzada, se ocluyen y no pueden ser distinguidos con esta técnica.

### **1.6.1.2 *Hemorragias intrarretinianas***

Las hemorragias tienen su origen en la rotura de microaneurismas, capilares y vénulas. Las profundas se localizan en las capas plexiforme externa y nuclear interna y se manifiestan como manchas rojas redondeadas. Las superficiales adoptan forma alargada en llama debido a que siguen el trayecto de las fibras nerviosas. Se originan a partir de las arteriolas precapilares superficiales.

### **1.6.1.3 *Exudados duros***

Los exudados duros son depósitos extracelulares de lípidos y lipoproteínas, extravasados debido a la hiperpermeabilidad de los vasos anormales. Se localizan fundamentalmente en la capa plexiforme externa de la retina, aunque pueden ocupar el espacio subretiniano y dañar los fotorreceptores (FR). En la oftalmoscopia se observan como depósitos blancoamarillentos de tamaño variable con límites irregulares pero bien definidos. Se pueden presentar en forma aislada o conformando anillos circinados (en forma de corona) rodeando a un microaneurisma.

### **1.6.1.4 *Exudados blandos***

Los exudados blandos representan infartos de la capa de fibras nerviosas. Se deben a la obstrucción de arteriolas retinianas terminales, correspondiéndose con acúmulos de material axoplásmico en el margen del infarto microvascular. En la exploración oftalmoscópica aparecen como manchas blanquecinas de bordes difusos. Si son numerosos es un signo de progresión rápida de la retinopatía que tiene alto riesgo de convertirse en RDP.

### **1.6.1.5 *Anomalías vasculares retinianas***

Las anomalías vasculares aparecen en respuesta a áreas de no perfusión e isquemia retiniana, por lo que son un signo de mal pronóstico, con una alta probabilidad de progresión a RDP. Entre las anomalías vasculares observadas en la RD se encuentran:

- *Arrosamiento venoso*: Son vénulas de calibre irregular, con zonas sucesivas de dilatación y estrechamiento.
- *Anomalías vasculares intrarretinianas (AMIR)*: Son una red de finos vasos capilares anómalos intrarretinianos de recorrido tortuoso que se forman como comunicaciones entre las arteriolas y las vénulas en zonas en las que existen oclusiones vasculares. Permiten la fuga de fluoresceína en la AGF, aunque no tan profusamente como los neovasos prerretinianos.

## 1.6.2 RETINOPATÍA DIABÉTICA PROLIFERATIVA

### 1.6.2.1 Neovasos

La formación de neovasos en la retina se produce en respuesta a la isquemia, que estimula la síntesis de factores angiogénicos. Suelen tener su origen en una vénula adyacente a la zona de no perfusión, pero en ocasiones nacen de arteriolas. Aunque inicialmente son intrarretinianos, acaban perforando la membrana limitante interna (MLI), haciéndose prerretinianos y formando adherencias con el vítreo suprayacente. Se acompañan de tejido fibroso o glial, que les proporciona un soporte y al contraerse este puede dar lugar a hemorragias prerretinianas o vítreas o incluso un desprendimiento de retina traccional o regmatógeno.

Los neovasos son capilares sin uniones estrechas entre sus células endoteliales, por lo que son parcialmente permeables y en la AGF muestran fuga del colorante.

En los estadios finales, con isquemias retinianas amplias o desprendimientos de retina extensos (Figura 9), puede producirse neovascularización en el iris o ángulo iridocorneal, pudiendo dar lugar a un glaucoma neovascular.

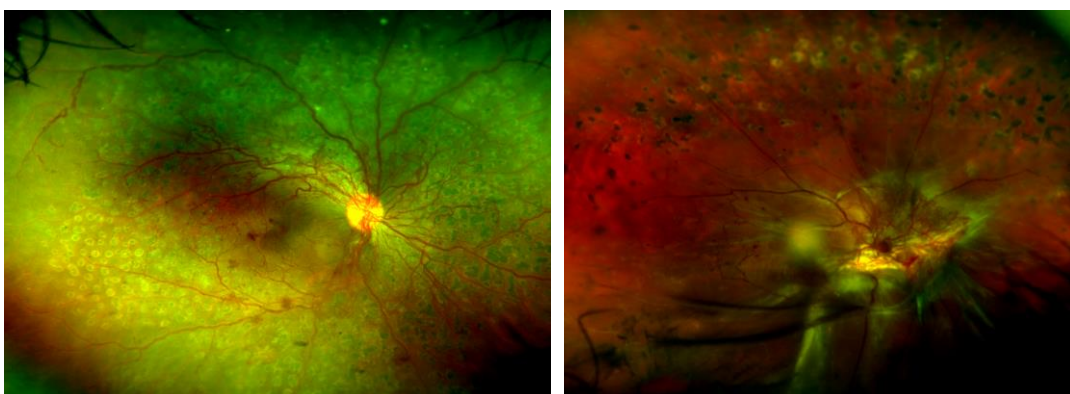


Figura 9. Fotografías retinianas de campo amplio que muestran dos casos de RDP con abundantes neovasos (izquierda) y proliferaciones fibrovasculares desencadenando un desprendimiento de retina traccional.



### 1.6.3 EDEMA MACULAR DIABÉTICO

El EMD puede aparecer en cualquiera de sus estadios: RD no proliferativa o proliferativa. Se trata de un engrosamiento de la retina por acúmulo de líquido en el área macular, en concreto entre la capa de Henle y la capa nuclear interna de la retina. Su aparición se debe a varios mecanismos (Bhagat et al., 2009):

- a) Pérdida de pericitos, alteración de las células endoteliales y disfunción de las uniones intercelulares.
- b) Secreción de factores que aumentan la permeabilidad vascular: VEGF, PKC, histamina, angiotensina II, metaloproteinasas, PEDF, PDGF, b-FGF.
- c) Adhesiones vítreoretinianas que producen tracción sobre la mácula.

Todo ello induce la rotura de las BHRs (la interna formada por el endotelio de los capilares retinianos y las células gliales (astrocitos y células de Müller) y la externa integrada por el epitelio pigmentario retiniano (EPR) y la membrana de Bruch), con la consiguiente salida de fluido desde los capilares y microaneurismas al espacio extracelular. A largo plazo la acumulación de líquido en el espacio extracelular puede causar la tumefacción de las células de Müller seguida de isquemia y necrosis de las mismas y las células nerviosas adyacentes. Esto dará lugar a la formación de espacios quísticos en la capa plexiforme externa.

Como se ha visto anteriormente puede ser focal o difuso. El **focal** se origina a partir del fluido que escapa de microaneurismas y capilares, observándose en la oftalmoscopia como un anillo parcial o completo de exudados duros. El edema macular **difuso** se produce como consecuencia de una ruptura generalizada de la BHR, produciendo engrosamiento retiniano más extenso asociado o no a exudados.

La RDP junto al EMD son las dos entidades clínicas que van a determinar el pronóstico visual de los pacientes con RD, ya que pueden conducir a una pérdida de visión significativa. El EMD es la causa más frecuente de disminución de la agudeza visual (AV) en los diabéticos. La RDP es la responsable de los déficits visuales más severos (Bloomgarden, 2008).

## 1.7 DIAGNÓSTICO

Para realizar un diagnóstico correcto del grado de RD es necesario conocer la historia clínica del paciente, el tipo y duración de su diabetes, y sobre todo conocer su control metabólico de la glucemia y de los factores de riesgo asociados.

El diagnóstico de la RD se realiza mediante un **estudio de fondo de ojo**, que debe ser anual a partir de los 5 años de diagnóstico de la diabetes tipo I y desde el momento del diagnóstico en los pacientes diabéticos tipo II. Posteriormente el cribado se realizará cada 2 o 3 años en pacientes diabéticos bien

controlados y sin RD aparente, y anual para pacientes sin RD pero con factores de riesgo asociados o pacientes con RDNP leve (Pareja-Ríos A, 2009).

En el diagnóstico y seguimiento de la RD se utilizan varias pruebas complementarias destacando principalmente la AGF y la OCT.

La **AFG** es una prueba de contraste en la que se inyecta fluoresceína sódica intravenosa y se realizan fotografías del fondo de ojo. Nos permite identificar múltiples lesiones que pueden pasar desapercibidas en la fundoscopia, valorar las zonas de neovascularización e isquemia y controlar los efectos del tratamiento aplicado.

La **OCT** es una prueba de diagnóstico por la imagen capaz de realizar cortes ópticos de la retina de 10 $\mu$  de grosor o menor que nos permiten ver una imagen casi histológica de las capas de la retina y las alteraciones que en ellas aparecen. En la RD es muy útil para el diagnóstico del EMD, su clasificación y documentar su evolución tras el tratamiento.

## **1.8 TRATAMIENTO**

Tanto el tratamiento sistémico como el tratamiento oftalmológico, son imprescindibles para el control de la RD y el EMD.

### **1.8.1 CONTROL DE LOS FACTORES DE RIESGO SISTÉMICOS**

La única actuación médica con capacidad demostrada para prevenir la incidencia y el desarrollo de la RD es mantener un buen control glucémico. Las actuales recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) (American Diabetes Association, 2003) marcan como objetivo niveles de glucemia en ayunas inferior a 110 mg/dl y una hemoglobina glicosilada (HbA1c) menor del 7%.

Además, igualmente es esencial el control del resto de factores de riesgo sistémicos como la dislipemia (LDL colesterol < 100mg/dl o <70mg/dl si alto riesgo cardiovascular), la HTA (mantener cifras inferiores a 130/80mmHg), la anemia, el sobrepeso y el estado renal (microalbuminuria en orina).

### **1.8.2 FOTOCOAGULACIÓN LÁSER**

El tratamiento mediante fotocoagulación láser ha sido clásicamente el "gold estándar" para tratar la RDP y el EMD, basándose en los resultados de dos grandes estudios multicéntricos: el Diabetic Retinopathy Study (DRS) (Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1981) y el ETDRS (ETDRS research group," 1985).

La eficacia de la fotocoagulación se basa principalmente en que disminuye el consumo de oxígeno por la retina al destruir las células fotorreceptoras (con elevado consumo de oxígeno) de las áreas isquémicas retinianas observadas en la AGF y sustituirlas por cicatrices gliales (con bajo consumo de oxígeno). De esta forma se reduce la producción de factores vasoproliferativos inducidos por la hipoxia retiniana y se produce una liberación de factores antiangiogénicos directamente desde el EPR

estimulado por el láser. La fotocoagulación induce la involución de los neovasos y previene las complicaciones derivadas de los mismos.

Existen dos tipos de tratamiento con láser: la panfotocoagulación (PFC) (consistente en fotocoagular toda la retina siguiendo unos patrones de impactos sobre el tejido con huecos entre ellos) y la fotocoagulación focal o en rejilla (que se aplica específicamente en el polo posterior para tratar el edema macular).

La principal indicación de la **PFC** es la RDP. Su objetivo no es mejorar la visión sino estabilizar la retinopatía y prevenir la pérdida visual severa. Se recomienda de 1200 a 1600 impactos desde las arcadas vasculares hacia el ecuador, separadas en la zona nasal 500  $\mu\text{m}$  de la papila y dos diámetros de disco de la zona temporal hasta el centro de la mácula (3.000  $\mu\text{m}$ ). Puede considerarse la PFC temprana en RDNP severas en pacientes con:

- Mal control metabólico
- Pacientes que no cumplan las revisiones de forma habitual
- Pacientes con RDP en el ojo adelfo
- Pacientes con cataratas que puedan limitar el futuro tratamiento o previamente a la cirugía de catarata
- Embarazo o deseo del mismo
- Áreas de isquemia generalizadas

La **fotocoagulación focal** está indicada en aquellos pacientes con EMCS (ver Tabla 4). En el caso de EMD focales o multifocales se tratan los microaneurismas que fuguen y se encuentren en el centro de las coronas circinadas. La AGF nos indica el estado de la red perifoveolar, identifica los microaneurismas y las zonas de fuga, siendo muy útil para planear el tratamiento. Se utiliza un spot de 50-100 micras, 0,05-0,1 segundos de duración y la potencia suficiente para producir un blanqueo suave de los mismos. En EMD difusos se realiza una **fotocoagulación en rejilla**, tratando todo el área macular cubriendo las 3000  $\mu\text{m}$  desde el centro de la mácula y 3500  $\mu\text{m}$  en el lado temporal, respetando las 500  $\mu\text{m}$  centrales y las 500  $\mu\text{m}$  peripapilares. En los casos con RD en lo que hayamos decidido realizar una PFC y que además presenten EMCS, se tratará primero éste y posteriormente se hará la PFC.

Los resultados iniciales de eficacia y seguridad del láser en el EMD del ETDRS apenas se han modificado tres décadas después de su publicación. Son bastante alentadores en los edemas focales, pero decepcionantes en los difusos. En líneas generales se puede afirmar que el tratamiento láser precoz consigue estabilizar la AV en un 50% de los pacientes, mejorarla sólo en el 10% de ellos (Cabrera y Armadá, 2012; ETDRS Research Group, 1987) y un porcentaje no desdeñable de pacientes experimentan pérdida de visión progresiva a pesar del láser. Además el uso a largo plazo del láser está limitado por riesgos y efectos adversos como escotomas centrales y paracentrales, pérdida de visión del color, alteración de la sensibilidad al contraste, aumento progresivo de las cicatrices y ocasionalmente neovascularización coroidea secundaria (Mitchell P, 2014). El láser subumbral de diodo y el láser PASCAL

se han desarrollado para minimizar las cicatrices y posibles complicaciones asociadas al láser. Sin embargo resultados a largo plazo son necesarios para evaluar mejor su papel.

En la actualidad aunque sigue ocupando un lugar destacado en los algoritmos de tratamiento, se ha visto desplazado por la llegada de las nuevas terapias antiangiogénicas y su papel está siendo redefinido (López-Gálvez y García-Campos, 2012).

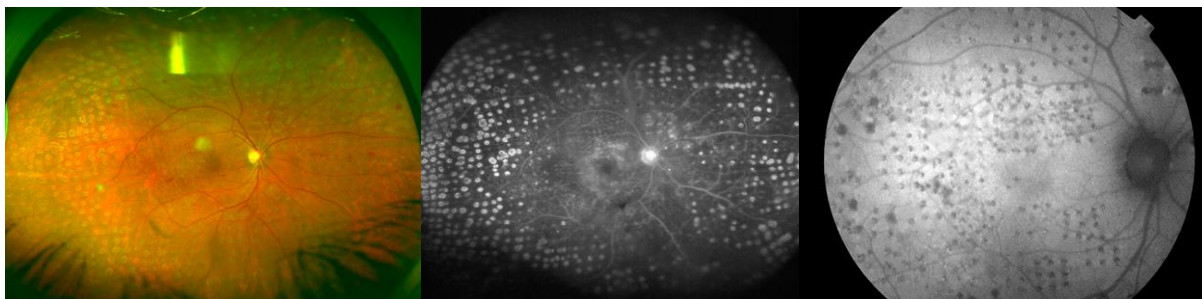


Figura 10. Fotografía retiniana, angiografía y autofluorescencia que muestran las cicatrices de una PFC y fotocoagulación en rejilla con láser PASCAL.

### **1.8.3 INHIBIDORES DEL VEGF (ANTI-VEGF)**

El mayor entendimiento de la fisiopatología de la RD y EMD, junto con el papel fundamental que desempeña el VEGF, pusieron en marcha la investigación de nuevas líneas de tratamiento que interfieren en la vía de transcripción y activación del VEGF para intentar no sólo estabilizar, sino recuperar la AV perdida en pacientes con RD y sobre todo EMD. A día de hoy son cuatro los fármacos que bloquean el VEGF: pegaptanib (Macugen®), ranibizumab (Lucentis®), bevacizumab (Avastin®) y aflibercept (Eylea®). A continuación se resumen los resultados de los ensayos más significativos que han proporcionado la evidencia científica sobre la que se sustenta hoy el uso de anti-VEGF para el tratamiento del EMD y la RD (Tabla 5).

#### **1.8.3.1 Antil-VEGF en el edema macular diabético**

##### **- PEGAPTANIB (MACUGEN®)**

Un estudio clínico de fase II/III multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo estudió la eficacia de 0,3 mg de pegaptanib para tratar el EMD durante dos años. El primer año incluyó 260 ojos y de ellos 207 completaron el segundo año. El tratamiento se administró cada 6 semanas durante el primer año y a demanda durante el segundo. A partir de la semana 18 los pacientes podían recibir también tratamiento con láser si persistía el EM. El grupo de pacientes tratados con pegaptanib ganaron una media de 6,1 letras comparado con 1,3 letras en el grupo control ( $p < 0,01$ ) a los dos años. Además los

pacientes tratados con pegaptanib requerían menos tratamientos con láser y tenían mejores puntuaciones en el “National Eye Institute Visual Functioning Questionnaire” (Sultan et al., 2011).

- **RANIBIZUMAB (LUCENTIS®)**

El “American Academy of Ophthalmology study group” (Ho AC et al., 2012) concluyó que cinco estudios proporcionan un nivel de evidencia I que apoya el uso de ranibizumab para el EMD: RESOLVE, READ-2, RESTORE, DRCR.net Protocol I y RISE-RIDE.

**Estudio RESOLVE (Massin et al., 2010)**

Estudio de fase II, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para evaluar la eficacia y seguridad del ranibizumab comparado con placebo durante 12 meses. Se incluyeron 151 pacientes con AV comprendidas entre 20/40 y 20/160 y un espesor macular central  $\geq 300\mu\text{m}$ . Los pacientes fueron aleatorizados para recibir 0,3 mg de ranibizumab, 0,5 mg o una inyección simulada. Se administraban 3 inyecciones mensuales consecutivas de carga y a continuación inyecciones a demanda en caso de tratamientos fallidos,  $< 50\mu\text{m}$  de disminución de espesor foveolar o  $< 5$  letras de ganancia de AV, interrumpiéndose en caso de AV  $\geq 79$  letras y espesor macular  $\leq 225\mu\text{m}$ . Además a partir de los 3 meses era posible rescatar pacientes, tratándoles con láser focal o rejilla o duplicar la dosis de ranibizumab.

Al finalizar el estudio la BCVA media mejoró 7,8 letras desde la visita basal en los grupos de ranibizumab comparados con -0,1 letras en el grupo placebo ( $P<0,0001$ ). Además los porcentajes de pacientes tratados con ranibizumab que ganaron  $\geq 10$  letras y  $\geq 15$  letras triplicaron a los del grupo placebo. La reducción en el espesor central retiniano también siguió la misma tendencia, con una disminución de 194,2  $\mu\text{m}$  en los grupos de ranibizumab frente a 48,8  $\mu\text{m}$  con la inyección simulada. Por otra parte, el porcentaje de pacientes que requirió tratamiento de rescate con láser fue inferior en el grupo de ranibizumab (4,9%) frente a 34,7% en el grupo de inyección simulada.

Este estudio permitió por lo tanto comprobar la eficacia del ranibizumab mensual intravítreo frente al placebo y se determinó la dosis de 0,5mg como la más eficaz y segura y con un buen perfil de seguridad.

**Estudio READ-2 (Nguyen et al., 2010)**

Estudio clínico de fase II, multicéntrico, aleatorizado, comparando ranibizumab con láser focal y la combinación de ambos durante 24 meses. Se aleatorizaron 126 pacientes con AV entre 20/40 y 20/320 y espesor macular central  $\geq 250\mu\text{m}$  en los siguientes grupos: grupo 1: 0,5mg ranibizumab en la visita basal y meses 1, 3 y 5; grupo 2: láser en la visita basal y al tercer mes si necesario; grupo 3: inyecciones de 0,5mg ranibizumab y láser en las visitas basal y al tercer mes. A partir de los 6 meses los pacientes de cualquiera de los 3 grupos podían ser retratados con ranibizumab cada dos meses o láser cada tres si el grosor macular central era  $\geq 250\mu\text{m}$ .

El cambio en BCVA desde la visita basal hasta el mes 24 fue de +7,7 letras para el grupo 1, +5,1 letras para el grupo 2 y +6,8 letras para el grupo 3, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los tres grupos. Observaron que los pacientes de los grupos 2 y 3 requerían un menor número de intravítreas que en el grupo 1 sin comprometer los resultados visuales, apuntando a que el tratamiento combinado con láser reducía el número de inyecciones. La media de inyecciones recibidas durante los 24 meses fue de 9,3, 4,4, y 2,9 para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente. Un tratamiento más agresivo con ranibizumab a partir del segundo año demostró que la BCVA podría mejorarse incluso 3,1 letras más ( $P=0,009$ ) en el grupo 1 (Do et al., 2013). En cuanto a los resultados anatómicos, también que se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos, con una mayor resolución del edema en los grupos 2 y 3.

Los datos obtenidos en este ensayo confirmaron que el ranibizumab intravítreo es eficaz en el tratamiento del EMD pero además pusieron de manifiesto que la combinación con láser contribuía a disminuir la incidencia del EMD persistente o recurrente, así como el número de intravítreas necesarias.

#### **Estudio RESTORE** (Lang et al., 2013; Mitchell et al., 2011; Schmidt-Erfurth et al., 2014)

Estudio de fase III multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con láser para estudiar la eficacia de 0,5 mg de ranibizumab como monoterapia o combinado comparado con el gold estándar: láser en monoterapia durante 12 meses. Se incluyó un total de 345 pacientes de 73 centros diferentes que presentaban AV entre 20/32 y 20/160. El tratamiento incluía una fase inicial de 3 inyecciones mensuales de carga seguidas de tratamiento continuado hasta estabilización de la AV con tratamiento PRN (“pro re nata” o a demanda). Después del año de seguimiento los grupos tratados con ranibizumab mostraron un resultado superior en el cambio medio de la AV comparado con el grupo de láser en monoterapia: +6,1 letras en el brazo de ranibizumab ( $p<0,0001$ ), +5,9 en el brazo ranibizumab combinado con láser ( $p<0,0001$ ) y +0,8 en el brazo con láser en monoterapia. El porcentaje de pacientes que ganaron  $\geq 10$  letras y  $\geq 15$  letras fue entre dos y tres veces mayor en los grupos tratados con ranibizumab comparados con el grupo del láser (37,4% frente a 15,5% y 22,6% frente a 8,2% respectivamente). Además hasta un 8,2% de los pacientes tratados con láser en monoterapia perdieron  $\geq 15$  letras comparado con sólo un 0,9% en el grupo del ranibizumab en monoterapia. La ganancia en AV se acompañó de una mejoría también en la escala de valoración de la calidad de vida relacionada con la salud, medida mediante el cuestionario NEI-VFQ (National Eye Institute Visual Function Questionnaire), mayor en los grupos tratados con ranibizumab.

La disminución en el espesor central de la retina fue también estadísticamente significativa a favor de los grupos tratados con ranibizumab. Este estudio realizó además un análisis de subgrupos atendiendo a si el edema macular era focal o difuso, a la severidad del EMD o la RD, encontrando también resultados significativamente mejores en los pacientes tratados con ranibizumab en sus dos brazos de tratamiento independientemente del tipo de EM.

Este estudio confirmó por tanto que ranibizumab era eficaz en el tratamiento del EMD incluso en monoterapia, siendo los resultados visuales superiores a los obtenidos en pacientes tratados sólo con láser focal o rejilla. Además ayudó a introducir el concepto de estabilización de la AV en el tratamiento de esta enfermedad y la necesidad de realizar una tanda inicial de inyecciones mensuales hasta alcanzar dicho efecto.

El estudio RESTORE inicial de 12 meses continuó durante dos años más mediante el **RESTORE extension study** (Lang et al., 2013; Schmidt-Erfurth et al., 2014), en el que los pacientes de los 3 grupos del estudio inicial siguieron recibiendo inyecciones de ranibizumab en régimen PRN asociado o no a láser. Los resultados avalaron la eficacia y seguridad del ranibizumab a largo plazo, manteniendo los resultados de ganancia de AV y disminución de espesor macular del primer año y con una disminución progresiva en el número de intravítreas: 7 inyecciones de media el primer año, 3,8 el segundo año y 2,6 el tercer año.

#### **Estudio DRCRnet** (Elman et al., 2010; Elman et al., 2011; Elman et al., 2012)

Ensayo clínico de cinco años, multicéntrico de fase III diseñado por la Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (DRCRnet) para evaluar la eficacia del ranibizumab y de la triamcinolona intravítreos en el tratamiento del EMD comparándolos con la terapia láser convencional. Se incluyeron 854 ojos de 691 pacientes con AV iniciales de 20/32 a 20/320 y espesor retiniano central  $\geq 250 \mu\text{m}$ . Los pacientes fueron aleatorizados para recibir inyección simulada más láser temprano (entre 3 y 10 días), 0,5mg de ranibizumab más láser temprano, 0,5mg de ranibizumab más láser diferido (a partir de 24 semanas) o 4mg de triamcinolona más láser temprano. El ranibizumab fue administrado posteriormente cada 4 semanas hasta la semana 12 y a partir de entonces a criterio del investigador con intervalos mínimos de 4 semanas entre inyecciones. Asimismo, la triamcinolona intravítrea podía ser administrada cada 16 semanas y el tratamiento con láser podía ser repetido cada 13 semanas.

Los resultados demostraron que el ranibizumab combinado con láser temprano o diferido era más efectivo que el láser en monoterapia. La ganancia en AV media al primer año fue de +9 letras en los grupos de ranibizumab más láser comparado con +3 letras en el grupo de láser más inyección simulada. El segundo año la AV continuó mejorando con un cambio medio de +3,7 letras con ranibizumab y láser temprano y +5,8 letras más con ranibizumab y láser diferido, mayores que en el grupo del láser en monoterapia. A los tres años el tratamiento combinado con láser temprano se asoció a un menor número de intravítreas que con el láser diferido, pero sin embargo los resultados visuales fueron mejores en el grupo del láser diferido (+6,8 letras frente a +9,7 letras respectivamente (P=0,02)).

Este estudio ayudó a establecer la superioridad del ranibizumab con láser temprano o diferido frente al láser y la terapia combinada con triamcinolona.

### **Estudios RISE and RIDE (Bressler et al., 2014; Brown et al., 2013; Nguyen et al., 2012)**

Se trata de 2 estudios paralelos metodológicamente idénticos de fase III, multicéntricos, aleatorizados, dobles ciegos y controlados con inyección simulada, comparando la eficacia y seguridad de 0,3 mg de ranibizumab y 0,5 mg de ranibizumab en 24 meses. Participaron 65 centros que incluyeron 759 pacientes, 377 para el estudio RISE y 382 para el estudio RIDE con AV entre 20/40 y 20/320 y espesor retiniano central  $\geq 275 \mu\text{m}$ . Se administraron 3 dosis de carga mensuales y luego control mensual y retratamiento en función de si el espesor macular central mayor o igual a  $250 \mu\text{m}$  con menos de  $50 \mu\text{m}$  de cambio respecto al mes anterior. A los tres meses se podía realizar además un tratamiento de rescate con láser. En ambos estudios la proporción de pacientes que ganaron  $\geq 15$  letras era el doble en los grupos de ranibizumab que con la inyección simulada con una ganancia media entre 8,5 y 9,9 letras al mes 24 en los pacientes tratados con ranibizumab ( $P < 0,0001$ ) comparados con la inyección simulada. Además la mejoría del edema macular se observó ya desde los 7 días del inicio del tratamiento y se observó que el tratamiento con ranibizumab reducía el riesgo de progresión de la RD y la necesidad de tratamientos de rescate con láser. Los resultados en el test de calidad visual NEI VFQ-25 también fueron superiores en los pacientes tratados con ranibizumab.

### **Estudio RETAIN**

Estudio fase IIIb, aleatorizado, simple ciego, multicéntrico y controlado, para evaluar la eficacia y seguridad de 0,5mg de ranibizumab en 3 algoritmos de tratamiento en pacientes con EMD: “treat and extend” (aumentando el intervalo de visitas y tratamiento según el paciente), en monoterapia o asociado a laserterapia, frente a ranibizumab en monoterapia según necesidad (PRN). Se han aleatorizado 373 pacientes de 67 centros. Los resultados aún no han sido publicados durante la realización de esta tesis, aunque resultados a 24 meses presentados en ARVO muestran la no-inferioridad del régimen treat and extend frente al PRN con una reducción en el número de visitas.

#### **- BEVACIZUMAB (AVASTIN®)**

### **Estudio BOLT (Michaelides et al., 2010):**

Se trata del primer estudio que avala el uso de bevacizumab para el EDM. Es un estudio de fase II, prospectivo, aleatorizado, controlado con láser de 2 años de duración en 80 pacientes con EMD persistente, AV entre 20/200 y 20/40 y espesor macular central  $\geq 270 \mu\text{m}$ . Los pacientes fueron aleatorizados para recibir 1,25 mg de bevacizumab cada 6 semanas (3 inyecciones de carga y reinyecciones hasta lograr la estabilización) o láser cada 4 meses. Los resultados a los dos años mostraron que los pacientes tratados con bevacizumab tenían una ganancia de +8,6 letras frente a la pérdida de 0,5 letras en el grupo del láser. La proporción de pacientes que ganaron  $\geq 15$  letras fue de 32% con bevacizumab y 4% con láser ( $P=0,004$ ). Además, mientras que ningún paciente tratado con bevacizumab perdió una cantidad  $\geq 15$  letras, 14% de los pacientes tratados sólo con láser la perdieron ( $P=0,03$ ).



### **Estudio de Soheilian y colaboradores**

Soheilian y colaboradores realizaron un estudio de fase III para evaluar la eficacia del bevacizumab en monoterapia o en combinación con triamcinolona frente al láser como tratamiento inicial para el EMD en 150 ojos (Soheilian et al., 2012). Después de tres inyecciones de carga se retrataba cada 12 semanas si la AV era inferior a 20/40 y persistía el edema macular. La AV mejoró 12,8% con bevacizumab, 9,5% en tratamiento combinado con bevacizumab y triamcinolona y -10,9% para el láser pero las diferencias no alcanzaron la significancia estadística. La proporción de ojos que ganaron  $\geq$  a 15 letras fue 41% para bevacizumab, 36,1% para tratamiento combinado y 23,7% para láser. El efecto superior del bevacizumab sólo fue significativo sobre otros tratamientos en el mes 6.

#### **- AFLIBERCEPT (EYELIA®)**

### **Estudio Da Vinci (Do et al., 2012; Do et al., 2011)**

Estudio multicéntrico randomizado doble ciego de fase II para evaluar la eficacia del VEGF-Trap (aflibercept) en comparación con el láser. 221 pacientes con EMD fueron aleatorizados para recibir uno de los siguientes cinco pautas de aflibercept diferente: 0,5 mg cada 4 semanas, 2 mg cada 4 semanas, 2 mg 3 meses y luego cada 8 semanas, 2 mg 3 meses y luego PRN o láser. A las 52 semanas los grupos tratados con aflibercept (9,7-12 letras) ganaron más letras que los ojos tratados con láser (-1,3 letras). Además los pacientes tratados con aflibercept tenían más probabilidad de ganar  $\geq$  15 letras que los tratados con láser (23,8%-45,5% frente a 11,4% respectivamente).

### **Estudios VISTA y VIVID (Korobelnik et al., 2014)**

Los resultados de estos dos estudios paralelos de similar diseño de fase III, multicéntricos, aleatorizados, doble ciego, controlados con láser han sido publicados recientemente. Incluyeron 872 pacientes, que fueron aleatorizados para recibir 2 mg de aflibercept cada 4 semanas, 2 mg de aflibercept cada 8 semanas después de 5 inyecciones mensuales de carga o láser. La media de letras ganadas a la semana 52 fue de 12,5 y 10,7 en los grupos de aflibercept frente a 0,2 letras en el grupo del láser en el estudio VISTA ( $P < 0,0001$ ) y 10,5 letras y 10,7 letras frente a 1,2 letras en el VIVID ( $P < 0,0001$ ). La reducción en el espesor macular central siguió la misma tendencia con reducciones de 185,9  $\mu\text{m}$  y 183  $\mu\text{m}$  frente a 73,3  $\mu\text{m}$  en el VISTA ( $P < 0,0001$ ) y 195  $\mu\text{m}$  y 192,4  $\mu\text{m}$  frente a 66,2  $\mu\text{m}$  en el VIVID ( $P < 0,0001$ ). Además se observó también una mejoría en la severidad de la RD. La pauta más idónea está aún por confirmar, pero la dosis cada 8 semanas después de 5 inyecciones de carga podría ser una buena opción para reducir el número de intravítreas y visitas.

Estos estudios han proporcionado por lo tanto nivel de evidencia I para el uso de aflibercept en el EMD.

En cuanto al perfil de seguridad de los anti-VEGF los posibles efectos adversos ocular incluyen endoftalmitis y aumento de la presión intraocular. El perfil de seguridad sistémico ha sido ampliamente estudiado en estudios para la degeneración macular asociada a la edad. En los estudios para EMD no se han encontrado diferencias en la tasa de efectos adversos entre el ranibizumab, inyección simulada o láser. La incidencia de eventos cardiovasculares y tromboembolismo arterial fue baja en estos estudios, posiblemente porque pacientes de alto riesgo fueron excluidos. El inferior número de pacientes del estudio BOLT hace difícil llegar a conclusiones sobre efectos adversos con el bevacizumab. Sin embargo estudios comparativos en pacientes con degeneración macular asociada a la edad como el CATT e IVAN (Chakravarthy et al., 2012; Martin et al., 2012) no encontraron diferencias en el número de eventos vasculares o muertes entre el bevacizumab y ranibizumab. El perfil de seguridad del aflibercept estudiado en el estudio DA VINCI era consistente con los de los otros fármacos anti-VEGF.

FÁRMACO	ESTUDIO (n)	RAMAS DE TTO	12 MESES			24 o 36* MESES		
			Ganancia media AV (nº letras)	Ganancia ≥ 15 letras (%)	Reducción media de GCR (µm)	Ganancia media AV (nº letras)	Ganancia ≥ 15 letras (%)	Reducción media de GCR (µm)
<b>Pegaptanib (P)</b>	Sultan et al, 2011 (260)	P 0,3mg	5,2	16,5	-	6,1	23,4	-
		Simulado	1,2	10,2	-	1,3	15,0	-
<b>Ranibizumab (Rbz)</b>	RESOLVE (151)	Rbz 0,3/0,6mg	9,2	18,0	200,7			
		Rbz 0,5/1,0mg	6,4	15,0	187,6			
		Simulado	-0,1	5,0	48,4			
	READ-2 (101)	Rbz 0,5mg				10,3*	32*	-
		Láser				1,4*	9*	-
		Combinación				8,9*	21*	-
	RESTORE (345)	Rbz 0,5mg	6,1	22,6	118,7	7,9	-	140,6
		Combinación	5,9	22,9	128,3	6,7	-	133,0
		Láser	0,8	8,2	61,3	5,4	-	126,6
	DRCRnet (854)	Láser inmediato	3,0	15,0	102,0	3,0	18,0	138,0
		Rbz + láser inmediato	9,0	30,0	131,0	7,0	29,0	141,0
		Rbz + láser diferido	9,0	28,0	137,0	9,0	28,0	150,0
		T + láser inmediato	4,0	21,0	127,0	2,0	22,0	107,0
	RISE (377)	Rbz 0,3mg				12,5	44,8	
		Rbz 0,5mg				11,9	39,2	
		Simulado				13,9	18,1	
	RIDE (382)	Rbz 0,3mg				10,9	33,6	
		Rbz 0,5mg				12,0	45,7	
Simulado					14,2	12,3		
RETAIN (373)	Rbz + láser (TE)	5,9	-	-	8,3	-		
	Rbz (TE)	6,1	-	-	6,5	-		
	Rbz (PRN)	6,2	-	-	8,1	-		
<b>Bevacizumab (Bvz)</b>	BOLT (80)	Bvz + T	8,0	11,9	130,0	9,1	32,0	146,0
		Láser	-0,5	5,3	68,0	-0,5	4,0	118,0
	Soheilian et al. 2012 (150)	Bvz				-	41,0	-
		Bvz + T				-	36,1	-
<b>Aflibercept (Abt)</b>	DA VINCI (221)	Abt 0,5mg/4s	11,0	40,9	165,4			
		Abt 2mg/4s	13,0	45,5	222,4			
		Abt 2mg/8s	9,7	23,8	187,8			
		Abt 2mg PRN	12,0	42,2	180,3			
		Láser	-1,3	11,4	58,4			
	VISTA (459)	Abt 2mg/4s	12,5	41,6	185,9			
		Abt 2mg/8s	10,7	31,1	183,1			
		Láser	0,2	7,8	73,3			
	VIVID (403)	Abt 2mg/4s	10,5	32,4	195,0			
		Abt 2mg/8s	10,7	33,3	192,4			
		Láser	1,2	9,1	66,2			

Tabla 5. Resumen de los resultados de los principales estudios con fármacos antiangiogénicos para el tratamiento del EMD.

### **1.8.3.2 Antil-VEGF en la retinopatía diabética**

#### **- RETINOPATÍA DIABÉTICA PROLIFERATIVA**

Casi el 60% de los pacientes con RDP tratados con PFC tienen una reducción de los neovasos a los 3 meses (Vander et al., 1991). Sin embargo una proporción de pacientes requieren sesiones de láser adicionales y el 4,5% acabarían necesitando una vitrectomía en el futuro a pesar de haber recibido una PFC completa (Flynn et al., 1992). Por otro lado varios estudios con antiangiogénicos para tratar EMD observaron que en los ojos tratados con anti-VEGF disminuía la severidad de la RD y probabilidad de progresión a RDP (Ip MS et al., 2012). Por ello se ha estudiado el papel de los fármacos antiangiogénicos para tratar la RDP.

Varios autores han descrito la eficacia del bevacizumab para reducir la neovascularización persistente tras la PFC (Ababneh et al., 2013; Cintra et al., 2013; Erdol et al., 2010; Jorge R et al., 2006), pudiendo observarse una rápida regresión ya a las 24 horas de la inyección (Avery et al., 2006). Por otro lado un estudio randomizado estudió la eficacia del ranibizumab asociado a la PFC para tratar ojos con RDP bilateral que no habían recibido ningún tratamiento previo. 60 ojos de 30 pacientes fueron aleatorizados para recibir PFC más dos inyecciones de ranibizumab (una semana antes de la PFC y otra al mes) o únicamente PFC. A los seis meses observaron que la AV era significativamente mejor en el grupo tratado con ranibizumab, así como la reducción del espesor retiniano central tanto en ojos con EM como en ojos sin edema. Este estudio pone de manifiesto que la combinación del ranibizumab con el láser puede dar lugar a mejores resultados en ojos con RDP con o sin EM, mejorando los resultados visuales y previniendo la aparición de EM tras el láser (Ferraz et al., 2014).

De forma análoga otro estudio randomizado evaluó la eficacia del bevacizumab asociado a la PFC frente a PFC en monoterapia en 41 ojos con RDP con o sin EM (Cho et al., 2009). El bevacizumab se aplicó también una semana antes del láser. Los resultados en AV, disminución del espesor macular fueron significativamente mejores en los ojos tratados con bevacizumab. Además se observó que en dicho grupo la progresión de los neovasos y la incidencia de hemovítreos eran significativamente menores. Otro estudio llevado a cabo por Tonello y colaboradores en 30 ojos, de similar diseño al anterior pero realizando dos sesiones de láser y aplicando el bevacizumab al final de la segunda sesión de láser. Los resultados mostraron también diferencias significativas entre los dos grupos con una mayor reducción de la neovascularización en el grupo tratado con bevacizumab (Tonello et al., 2008).

Ernst y colaboradores analizaron la eficacia del bevacizumab en monoterapia aplicado cada 2 meses frente al láser en pacientes con RDP o RDNP severa que no habían recibido tratamientos previos. Incluyeron 20 ojos que fueron seguidos durante un año. Encontraron que la neovascularización se reducía en un mayor proporción de ojos del grupo tratado con bevacizumab, la incidencia de hemovítreos fue menor, así como el espesor macular central (Ernst et al., 2012). Sin embargo, serían

necesarios estudios aleatorizados con un mayor número de pacientes para avalar el uso del bevacizumab en monoterapia para el tratamiento inicial de la RD.

#### - **HEMOVÍTREOS**

Algunos autores recomiendan considerar el uso de anti-VEGF en caso de hemovítreo persistente una vez descartada la presencia de un DR traccional (Jonas et al., 2008; Ruiz-Moreno et al., 2008; Spaide y Fisher, 2006). Se ha observado que el uso de bevacizumab reduce el tiempo de duración del hemovítreo así como la necesidad de vitrectomías aproximadamente en un 30% (Ahmadieh et al., 2009; Huang et al., 2009). Del mismo modo también se ha observado que reduce el número de hemovítreos después de vitrectomía comparado con ojos que no han recibido bevacizumab 39,3-42,4% frente a 4-11,4% (Ahmadieh et al., 2009; Cheema et al. 2010).

#### - **COMO TRATAMIENTO COADYUVANTE EN LAS VITRECTOMÍAS**

Se ha observado que los anti-VEGF como tratamiento previo 5-7 días a la vitrectomía reducen el riesgo de sangrado intraocular durante la cirugía. Además disminuyen el grosor de las proliferaciones fibrovasculares, reduciendo los tiempos quirúrgicos al facilitar su disección. (Han et al., 1988). Un reciente meta análisis de 8 estudios controlados aleatorizados determinó que el tiempo quirúrgico se veía reducido en 26,89 minutos de media, ( $P < 0,00001$ ), así como la necesidad de endodiatermia quirúrgica ( $P = 0,02$ ) comparado con vitrectomías sin el uso de anti-VEGF previo. Además los grupos tratados con bevacizumab tenían menor sangrado intraoperatorio y hemovítreos recurrentes durante el primer mes y una menor incidencia de roturas retinianas durante la cirugía (Zhang et al., 2013).

#### - **GLAUCOMA NEOVASCULAR**

Se ha observado una regresión rápida de la neovascularización del iris y el ángulo en pacientes con glaucoma neovascular tratados con anti-VEGF, por lo que se utilizan también para tratar esta complicación de la RDP (Iliev et al, 2006; Mason et al., 2006).

#### **1.8.4 CORTICOIDES INTRAVÍTREOS**

Los corticoides intraoculares no sólo inhiben la producción de mediadores pro-inflamatorios (Tamura et al., 2005), sino que también inducen una estabilización de la BHR y son potentes agentes antiangiogénicos al inhibir la expresión del VEGF (Fischer et al., 2001). Por todo ello se han administrado tanto en monoterapia como en terapias combinadas junto al láser en algunos EMD refractarios. Los corticoides intraoculares disponibles actualmente son el acetónido de triamcinolona y dos dispositivos de liberación prologada: dos de acetónido de fluocinolona (Retisert® e Iluvien®) y otro de dexametasona (Ozurdex®).

#### - **ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA**

Un estudio de fase III del Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, 2008) comparó los efectos de 1 mg y 4 mg de acetónido de triamcinolona intravítreo con láser en 840 ojos de 693 pacientes con EMD. Los retratamientos se realizaban cada 4 meses en función de la persistencia del EM. En este estudio, a pesar de una mayor respuesta inicial con la dosis de 4mg de triamcinolona a los 4 meses, los resultados a 2 y 3 años mostraron que el tratamiento con láser era superior. El cambio de AV a los 3 años fue de +5 en el grupo del láser y 0 en los grupos de triamcinolona. Además el perfil de efectos adversos era mayor con la triamcinolona: la probabilidad de necesitar cirugía de cataratas a los 3 años era de 31% en el láser, 46% con 1 mg de triamcinolona y 83% en el grupo de 4 mg. La presión intraocular aumento más de 10 mmHg en alguna de las visitas en el 4%, 18% y 33% respectivamente.

En otro estudio del DRCNnet en el que comparaban 0,5mg de ranibizumab combinado con láser temprano o diferido, 4 mg de triamcinolona con láser temprano o láser en monoterapia, en ojos pseudofáquicos el cambio en AV fue 1,6 letras mayor en el grupo de triamcinolona más laser comparado con láser en monoterapia. Los resultados además fueron comparables a la mejoría observada con ranibizumab más láser (Elman et al., 2010).

#### - **DISPOSITIVO DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE 0,59MG DE ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA (RETISERT®)**

Otro estudio multicéntrico de fase II/III (Pearson et al., 2011) en 196 pacientes comparó 0,59 mg de acetónido de fluocinolona con láser en EM persistentes. A los 3 años 31,1% de los ojos tratados con el implante ganaron  $\geq 15$  letras comparado con 20% de los pacientes tratados con láser ( $P=0,1566$ ). Sin embargo la tasa de efectos adversos fue superior. La presión intraocular fue mayor o igual a 30 mmHg en el 61,4% de los ojos que recibieron el implante, 33,8% requiriendo cirugía. De los ojos fáquicos el 91% requirieron cirugía de catarata.

#### - **DISPOSITIVO DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE 0,2-0,5 $\mu$ m DE ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA (ILUVIEN®)**

#### **Estudio FAME (Campochiaro et al., 2012; Campochiaro et al., 2011; Cunha-Vaz et al., 2014)**

Dos estudios paralelos de idéntico diseño (FAME A y FAME B) de fase III, multicéntricos, aleatorizados, doble ciegos, controlados con placebo para evaluar la eficacia y perfil de seguridad de este otro dispositivo de liberación prolongada de acetónido de fluocinolona. Un total de 956 pacientes entre los dos estudios fueron randomizados para recibir implantes de 0,2  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g o inyección simulada. A los 36 meses el porcentaje de pacientes que ganaron  $\geq 15$  letras fue 28,7%, 27,8% y 18,9% respectivamente ( $P=0,0018$ ). La eficacia fue similar para las dos dosis, pero el perfil de efectos adversos menor con la dosis de 0,2  $\mu$ g. Además, un análisis por subgrupos observó que el porcentaje de pacientes que ganaban  $\geq 15$  letras era mayor en los EMD crónico de más de 3 años de duración (34%, 28,8% frente

a 13,4% en el placebo  $P < 0,001$ ), sin encontrar diferencias en pacientes con EMD no crónico, pudiendo suponer una opción para pacientes que no respondan a otros tratamientos. Sin embargo, la tasa de efectos adversos secundarios fue también alta: De los pacientes fúquicos el 80% y 87,2% precisaron cirugía de cataratas frente al 27,3% en el grupo placebo. Por otro lado el 4,8% y 8,1% precisaron cirugía de glaucoma en los grupos de 0,2  $\mu\text{g}$  y 0,5  $\mu\text{g}$  respectivamente.

- **DISPOSITIVO DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE DEXAMETASONA (OZURDEX®) (Haller et al., 2010)**

Recientemente se han publicado los estudios del Ozurdex MEAD Study Group (Boyer et al., 2014). Dos estudios de fase III multicéntricos, aleatorizados, controlados con placebo que incluyeron 1048 pacientes con EMD. Los pacientes fueron aleatorizados a recibir un implante de 0,7 mg de dexametasona, 0,35 mg o inyección simulada. Los pacientes podían ser retratados cada 6 meses. El porcentaje de pacientes con ganancias  $\geq 15$  letras fue 22,2%, 18,4% y 12% ( $P \leq 0,018$ ) en los grupos de 0,7 mg, 0,35 mg e inyección simulada. La reducción del grosor macular central fue de -111,6, -107,9 y -41,9 respectivamente ( $P < 0,001$ ). Los efectos adversos fueron algo inferiores que con el Iluvien o Retisert. De los pacientes fúquicos el 59,2%, 52,3% y 7,2% respectivamente fueron intervenidos de cataratas. La mayoría de los casos de hipertensión ocular fueron controlados con medicación o no necesitaron tratamiento y sólo el 0,6% de los pacientes del grupo de 0,7 mg de ozurdex y 0,3% en el de 0,35 mg precisaron cirugía de glaucoma.

**Estudio BEVORDEX**

Por último, otro estudio de fase II multicéntrico aleatorizado ha comparado la eficacia del Ozurdex con bevacizumab. 88 ojos se aleatorizaron para recibir bevacizumab cada 4 semanas u Ozurdex de 0,7mg cada 16 semanas en pauta PRN. 31% tratados con bevacizumab mejoraron  $\geq 15$  letras comparado con 22% con Ozurdex. Sin embargo los resultados anatómicos fueron mejores en el grupo tratado con Ozurdex: -187  $\mu\text{m}$  frente a -122  $\mu\text{m}$  en 12 meses con un menor número de inyecciones: 8,6 frente a 2,7.

En la práctica clínica la presencia de efectos adversos como catarata e hipertensión ocular con el uso de corticoides intraoculares ha limitado el uso de estos tratamientos. Se utilizan sobretudo en ojos pseudofúquicos con EM persistentes que no respondan a anti-VEGF.

FÁRMACO	ESTUDIO (n)	RAMAS DE TTO	12 MESES			24 o 36* MESES		
			Ganancia media AV (nº letras)	Ganancia ≥ 15 letras (%)	Reducción media de GCR (µm)	Ganancia media AV (nº letras)	Ganancia ≥ 15 letras (%)	Reducción media de GCR (µm)
Acetónido de triamcinolona (T)	DRCR.net (840)	T 1mg	-	-	-	-2,0	14,0	86,0
		T 4mg	-	-	-	-3,0	17,0	77,0
		Láser	-	-	-	1,0	18,0	139,0
Acetónido de fluocinolona - RETISERT (F)	Pearson et al. 2011 (196)	F 0,59mg	-	16,4	-	-	31,8	-
		Láser	-	8,1	-	-	9,3	-
Acetónido de fluocinolona - ILUVIEN (F)	FAME (956)	F 0,2µ	-	-	-	7,6*	28,7*	-
		F 0,5µ	-	-	-	6,2*	27,8*	-
		Simulado	-	-	-	1,8*	18,9*	-
Liberación prolongada dexametasona (O)	MEAD (1048)	O 0,7mg	-	-	-	3,5*	22,2*	-111,6*
		O 0,35mg	-	-	-	3,6*	18,4*	-107,9*
		Simulado	-	-	-	2*	12*	41,9*
	BEVORDEX (88)	Bvz	8,9	31,0	122,0	-	-	-
		O 0,7mg	5,7	22,0	187,0	-	-	-

Tabla 6. Resumen de los resultados de los principales estudios con corticoides intravítreos para el tratamiento del EMD.



### **1.8.5 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO**

El objetivo final de la vitrectomía es restaurar la visión eliminando las opacidades y las tracciones y efectuando un tratamiento de la RD de base mediante la ablación de las aéreas isquémicas con la fotocoagulación. En los 80s el estudio sobre la vitrectomía en la RD (DRVS: Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study), marcó las bases de las indicaciones de cirugía en los pacientes con RD. Las indicaciones pueden agruparse en tres categorías:

1. Actuación sobre medios opacos: Hemorragias vítreas persistentes, hemorragias premaculares densas.
2. Complicaciones traccionales: Desprendimiento de retina traccional que amenace la mácula y edema macular traccional, tracción macular progresiva y heterotopía macular, desprendimiento de retina combinado (traccional y regmatógeno), proliferación fibrovascular ecuatorial severa o hialoidea anterior.
3. Otras: Proliferación neovascular severa, glaucoma por células fantasma, edema macular no traccional resistente a tratamiento.

El papel de la vitrectomía como tratamiento para el EMD refractario todavía no está del todo claro. Varios estudios randomizados controlados con o sin pelado de la MLI se han llevado a cabo. Aunque con reducción del espesor macular los resultados en cuanto a AV varían entre estudios. (Simunovic et al., 2014) si no hay tracción.

### **1.8.6 NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LA RD**

El mejor conocimiento de la etiopatogenia de la RD está dando lugar a nuevas y prometedoras perspectivas farmacológicas para su tratamiento. Entre ellas destacan:

- Antioxidantes
- Inhibidores de la PKC
- Inhibidores de la aldosa reductasa
- Sustancias que inhiben la formación de productos avanzados de la glicosilación (aminoguanidina)
- Análogos de la SST

## 2 ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS

### 2.1 FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

#### 2.1.1 CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como un estado celular en el que se encuentra alterada la homeostasis de la óxido-reducción intracelular. Este fenómeno se produce a causa de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y su eliminación por el sistema de defensa antioxidante en favor de los primeros (Sies H, 1991).

Fisiológicamente existe una producción de ROS que es permanentemente equilibrada por antioxidantes, manteniendo las células un entorno reductor. Sin embargo en determinadas situaciones esta homeostasis puede romperse provocando un sufrimiento celular que puede desencadenar la apoptosis o necrosis celular.

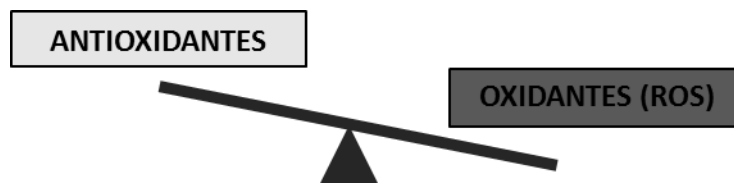


Figura 11. La situación de predominio de sustancias pro-oxidantes sobre las antioxidantes se denomina estrés oxidativo.

#### 2.1.2 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)

Las ROS incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son moléculas altamente reactivas debido a la presencia de un electrón desapareado en su orbital más externo (Halliwell B, 1990). Esta estructura química hace que tiendan a reaccionar con moléculas cercanas para captar un electrón y convertirse en moléculas más estables. En este proceso desestabilizan la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo desencadenar de esta forma reacciones en cadena.

### 2.1.2.1 **Generación de ROS**

Las ROS pueden proceder de fuentes metabólicas endógenas o agresiones exógenas.

Las **fuentes endógenas** incluyen:

- La cadena de transporte electrónico mitocondrial (Kás y Blatná, 1986).
- Una excesiva actividad de la NADPH oxidasa fagocitaria (Gabig y Babior, 1979).
- La activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard PG, 1994).
- La hiperactividad de la xantino oxidasa en situaciones de isquemia-reperfusión (Chambers et al., 1985).
- La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) (Beckman et al., 1990).
- La deslocalización de metales de transición ( $Fe^{2+}$  y  $Cu^{+}$ ) de sus sitios de depósito.
- En los últimos años se ha evidenciado la sobreproducción de ROS en procesos patológicos como procesos inflamatorios, enfermedades metabólicas y procesos degenerativos (Kohen y Nyska, 2002).

Las principales **fuentes exógenas** (García-Medina J, 2007) de ROS son:

- El exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en los que hay fenómenos de isquemia-reperfusión.
- Radiación ultravioleta o radiaciones ionizantes.
- Tabaco y contaminantes ambientales (disolventes, plaguicidas).
- Fármacos y xenobióticos (adreamicina, narcóticos, gases anestésicos, pesticidas, herbicidas, alcohol, etc).
- Ozono
- Alimentos

### 2.1.2.2 **Mecanismos de daño celular por las ROS**

Las ROS se producen continuamente en todas las células y participan en funciones celulares fisiológicas como la señalización celular, la defensa antimicrobiana, antitumoral o antiinflamatoria (Bourbon et al., 2004). Sin embargo un exceso de ROS puede dañar moléculas vitales para los seres vivos, alterar la homeostasis celular y conducir por lo tanto a situaciones patológicas (Kowluru y Chan, 2007).

A continuación se enumeran los principales mecanismos a través de los cuales las ROS producen daño celular:

- ***Daño a lípidos:*** La peroxidación lipídica da lugar a una alteración de las membranas celulares lo que condiciona una rápida muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1984). Las membranas son vulnerables a la oxidación debido a su alta concentración en ácidos grasos poliinsaturados, cuya estructura química es extremadamente sensible a la agresión por ROS.
- ***Daño a proteínas:*** La oxidación de aminoácidos, fragmentación de proteínas y entrecruzamiento y agregación de proteínas conlleva graves trastornos del metabolismo y la arquitectura celular (Stadtman, 1992).
- ***Daño a ácidos nucleicos:*** Las especies reactivas son capaces de alterar tanto el ADN mitocondrial como el ADN nuclear a través de deleciones, mutaciones o fragmentación entre otros trastornos estructurales que pueden conllevar aberraciones o pérdidas cromosómicas (Fraga et al., 1990).

Todos estos procesos dan lugar a una alteración funcional que frecuentemente desencadena apoptosis o muerte celular (Valko et al., 2007).

### **2.1.3 MECANISMOS DE DEFENSA ANTE EL ESTRÉS OXIDATIVO**

Como consecuencia de la producción continua de ROS y de sus posibles efectos deletéreos, el organismo dispone de sistemas de defensa antioxidante. Ante una disminución en la actividad antioxidante, aumentará el estrés oxidativo.

Los principales antioxidantes se describen a continuación:

- ***Sistemas de defensa enzimáticos:*** Mecanismos intracelulares en los que las enzimas eliminan las ROS una vez formadas.
  - Superóxido dismutasa
  - Catalasa
  - Glutathion peroxidasa
- ***Captadores de ROS:*** Entretienen las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a las ROS transformándolos en otras sustancias menos agresivas.
  - Glutathion (GSH)
  - Vitamina C (ácido ascórbico)
  - Vitamina E (d- $\alpha$ -tocoferol)
  - Carotenoides como la luteína
- ***Quelantes de metales de transición:*** Moléculas captadoras de hierro o cobre, impidiendo que actúen como catalizadores de reacciones formadoras de ROS.

Existen muchas otras sustancias con capacidad antioxidante que pueden producirse en el organismo o provenir de la dieta. Entre ellas destacan el ácido úrico, la N-acetilcisteína, penicilamida, los ésteres de GSH y el ácido lipoico.

ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	ANTIOXIDANTES
Anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> )	Superóxido dismutasa
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Catalasa
Radical hidroxilo (OH <sup>·</sup> )	Glutation peroxidasa
Radical alcoxi (RO <sup>·</sup> ) y peroxi (ROO <sup>·</sup> )	Glutation
Peroxinitrito (OONO <sup>·</sup> )	Vitamina C
Oxígeno singlete (1 O <sub>2</sub> )	Vitamina E
Hipoclorito (ClO <sup>-</sup> )	Carotenoides
Óxido nítrico (NO)	

Tabla 7. Resumen de las principales ROS y sustancias antioxidantes.

## 2.2 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

### 2.2.1 ESTRÉS OXIDATIVO, DIABETES Y RETINOPATÍA DIABÉTICA,

Existen numerosos trabajos que relacionan al estrés oxidativo con la diabetes. Por un lado la DM da lugar a un aumento de estrés oxidativo a través de diversos mecanismos y por otro lado el estrés oxidativo contribuye en la fisiopatología de la diabetes y sus complicaciones (neuropatía, nefropatía, cardiopatía y RD) (Baynes, 1991).

### 2.2.2 LA RETINA COMO DIANA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La retina es un tejido especialmente susceptible al daño por estrés oxidativo debido a varias razones (Schmidt et al., 2003):

- La retina está expuesta de forma prolongada a la energía radiante. La absorción de luz por moléculas fotosensibles conduce a reacciones fotoquímicas que dan lugar a la formación de ROS.
- En la retina se producen gran cantidad de ROS debido al elevado contenido en mitocondrias de los FR y a que es un tejido con uno de los consumos de oxígeno más altos del organismo.
- En la retina existen abundantes moléculas diana susceptibles al daño oxidativo (ácidos grasos poliinsaturados) en el segmento externo de los bastones.

Todo ello crea un ambiente donde la producción de RL es alta y por tanto el nivel de sustratos del daño oxidativo es elevado.

### 2.2.3 DESEQUILIBRIO OXIDANTE-ANTIOXIDANTE EN LA RD

En la RD existe una desproporción entre los niveles de oxidantes y antioxidantes, lo que explica la situación de estrés oxidativo que encontramos en la retina de los pacientes diabéticos.

Los niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno están elevados en la retina de ratas diabéticas y en células retinianas cultivadas en medios glucosados. Además se ha observado como la peroxidación

de membranas lipídicas y el daño oxidativo al ADN causados por ROS están elevadas en la retina diabética (Kowluru y Chan, 2007).

Por otra parte se ha observado en modelos animales diabéticos una disminución en el sistema de defensa antioxidante, lo que favorece las lesiones celulares asociadas a ROS: enzimas SOD, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, catalasa, y moléculas como la vitamina C, vitamina E y B caroteno (Miranda M et al., 2007; Williams et al., 2013).

Además en muestras obtenidas a partir del vítreo de pacientes diabéticos con RDP que iban a ser intervenidos de vitrectomía se ha detectado un aumento significativo de la formación de RL y una actividad antioxidante disminuida respecto a muestras vítreas obtenidas de pacientes sin trastornos retinianos proliferativos (Vlassara y Palace, 2002).

#### **2.2.4 RELACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON LAS OTRAS VÍAS IMPLICADAS EN LA PATOGENIA DE LA RD**

El estrés oxidativo se ha relacionado además con la activación de las cuatro vías metabólicas principales implicadas en la patogenia de la RD. Por ello Brownlee y colaboradores propusieron al estrés oxidativo como mecanismo unificador de todas las demás vías para explicar la lesión tisular inducida por la glucosa en la diabetes (Brownlee M, 2001; Brownlee M, 2005b).

La mayor disponibilidad de glucosa en el interior de las células incrementa el flujo de electrones a través de la cadena de transporte mitocondrial, lo que conduce a la hiperproducción de anión superóxido. Dicha hiperproducción hace que se inhiba la enzima glicolítica GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), lo que activa la **vía de los polioles**, la **vía de los productos finales de la glucosilación proteica**, la **activación de la proteinquinasa C** y la **vía de las hexosaminas** (Brownlee, 2001; Brownlee M, 2005b).

A su vez varias de estas vías pueden aumentar el estrés oxidativo por aumento de las sustancias oxidantes o disminución de la defensa antioxidante. Esto genera un mecanismo de retroalimentación en el que se amplifica todavía más el daño tisular. Los mecanismos por los que el estrés oxidativo aumenta en algunas de las vías son los siguientes (Kowluru y Chan, 2007):

1. Vía de los polioles: Se produce una depleción del antioxidante GSH.
2. Vía de los productos finales de la glucosilación proteica: Producción de ROS y NOS que desencadenaran una serie de eventos que darán lugar a apoptosis de las células capilares retinianas por la activación de NF- $\kappa$ B (Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas) y caspasa-3.
3. Activación de la PKC: Diferentes ensayos han descrito que la inhibición de la PKCB previene el estrés oxidativo inducido por la diabetes. Además ratones que carecen de esta isoforma de la PKCB están protegidos frente al estrés oxidativo.

Por otra parte se ha descrito que la expresión retiniana del **VEGF** se eleva en presencia de las ROS y que por lo tanto el estrés oxidativo media en alguno de los efectos patológicos del VEGF en las complicaciones microvasculares de la diabetes (Wang et al., 2011).

El estrés oxidativo promueve además la **inflamación** retiniana. Modelos animales de RD muestran como la actividad de la NADPH oxidasa se asocia con las vías inflamatorias que promueven la adhesión y aumento de la permeabilidad vascular (Tawfik et al., 2009).

La interrelación entre las diferentes vías patogénicas de la RD y el estrés oxidativo se resume en la siguiente figura:

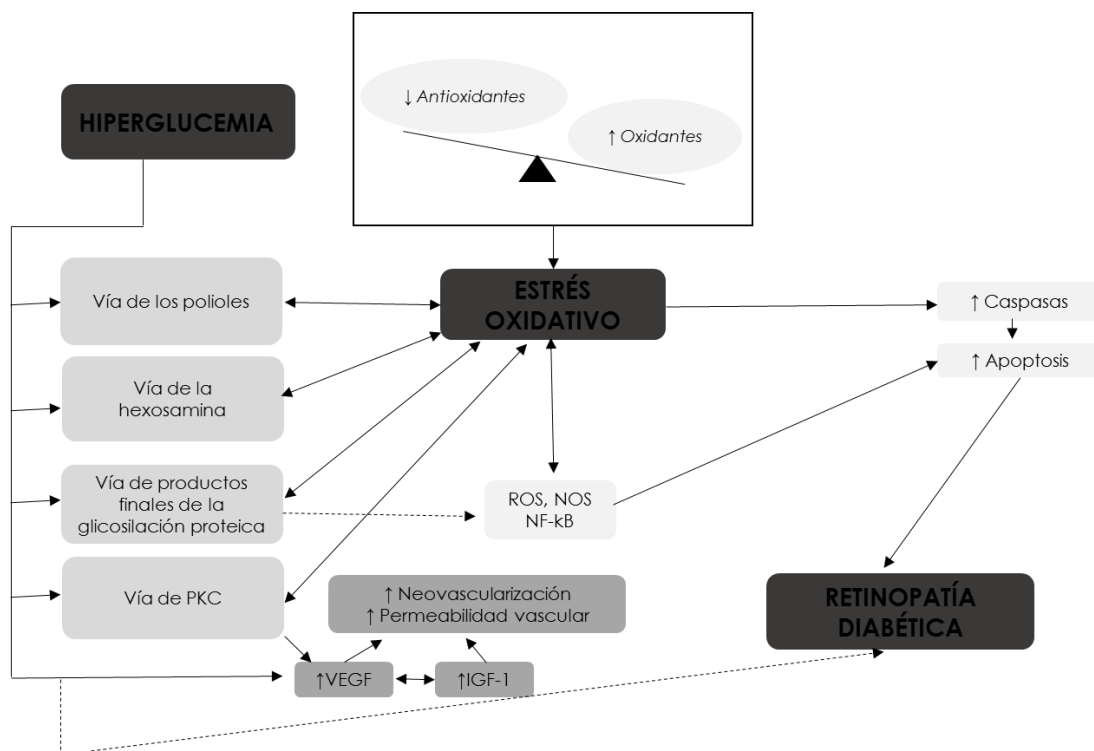


Figura 12. Esquema de la interrelación entre RD, estrés oxidativo y apoptosis. Adaptada de Kowluru R, Experimental Diabetes Research 2007.

### 2.2.5 ANTIOXIDANTES UTILIZADOS EN LA RD

La implicación del estrés oxidativo en la patogenia de la RD ha abierto una vía de investigación en la que se ha estudiado el papel de la dieta o suplementos antioxidantes para prevenir o retrasar la progresión de la RD. Estudios experimentales han demostrado que los antioxidantes pueden prevenir o retrasar el desarrollo de RD en modelos animales (Arnal et al., 2009). Por otra parte observaciones clínicas sugieren también que reducir el estrés oxidativo puede contribuir a revertir las manifestaciones patológicas de la RD.

Entre los antioxidantes estudiados en animales o cultivos celulares están:

- **Taurina:** Los suplementos con taurina en un modelo de diabetes en ratas producen una mejoría de la RD que puede explicarse por una inhibición de la apoptosis de las células gliales (Zeng et al., 2010), disminución de la reactividad glial, del VEGF y de la toxicidad del glutamato (Zeng et al., 2009). Otro estudio en células del EPR también ha descrito una disminución de la apoptosis de las células del EPR tratadas con taurina (Song et al., 2012).
- **Ácido Lipoico:** Disminuye el número de células capilares retinianas en apoptosis, disminuyendo las lesiones en la microvascularización retiniana (Kowluru y Odenbach, 2004). También se ha observado que disminuye el VEGF (Obrosova et al., 2001) y protege a las células ganglionares del daño por estrés oxidativo en la RD (Johnsen-Soriano et al., 2008; García-Pous M, 2008).
- **D-alfa tocoferol (vitamina E):** En ratas diabéticas evitó el desarrollo de las anomalías iniciales del flujo sanguíneo retiniano propias de la RD (Kunisaki et al., 1998), previniendo así las alteraciones vasculares de la retina (Kuisaki M et al., 1995).

Otros antioxidantes estudiados en modelos animales en los que se ha observado efectos protectores han sido el te verde, zeaxantina, luteína, benfotiamina, zinc o curcumina (Kowluru y Chan, 2007; Madsen-Bouterse y Kowluru, 2008; Muriach et al., 2008),

En humanos los antioxidantes más estudiados para la RD han sido:

- **Tocoferol (Vitamina E).** Se ha detectado una mejoría significativa del flujo sanguíneo retiniano en pacientes diabéticos tipo I sin RD o con una RD en fase muy inicial tras 4 meses de tratamiento con tocoferol (Bursell et al., 1999).
- **Ácido Lipoico:** Se ha detectado una mejoría del ERG en pacientes diabéticos tratados con ácido  $\alpha$ -lipoico asociado a vitaminas C, E y B, comparados con un grupo control tratados con placebo (Nebbioso M, 2012).

Por otro lado algunos estudios no han encontrado relación entre la administración de antioxidantes y la mejoría de la RD (Millen et al., 2003; Millen et al., 2004; Robison et al., 2000), por lo que por el momento no se conoce con exactitud el papel que estos compuestos pueden jugar en la prevención y tratamiento de la RD. Son necesarios más estudios para aclarar el potencial beneficio de su utilización en el futuro.

## 2.3 APOPTOSIS

### 2.3.1 CONCEPTO DE APOPTOSIS

La apoptosis es una muerte celular programada que juega un papel central en la embriogénesis y en la homeostasis de los tejidos. Morfológicamente se caracteriza por la condensación de la cromatina del



núcleo y segmentación del núcleo, formación de burbujas en la membrana que finalmente dará lugar a la desintegración celular y a la formación de los cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por los macrófagos, sin pérdida alguna del contenido celular al exterior (Kerr et al., 1972).

La apoptosis provee al organismo de un método seguro para mantener la integridad del organismo permitiéndole eliminar las células dañadas o anormales sin comprometer a las células vecinas. En organismos sanos existe un equilibrio entre la apoptosis y la proliferación celular para lograr una homeostasis en el desarrollo embriológico y el recambio celular durante la vida.

### **2.3.2 APOPTOSIS Y RETINOPATÍA DIABÉTICA**

Se ha visto que la apoptosis desempeña un papel importante en la progresión y patogenia de la RD (Allen et al., 2005), tratándose de una vía común final de pérdida celular y por tanto de pérdida de visión (Doonan et al., 2009). Se ha descrito además que las células retinianas vasculares y neuronales se pierden de forma selectiva a través de apoptosis antes de que otro cambio histopatológico sea detectable en la diabetes (Kern et al., 2000; Mizutani et al., 1996), siendo este un fenómeno presente ya en las fases iniciales de la RD.

### **2.3.3 CAUSAS DE APOPTOSIS EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA**

Entre los desencadenantes de la apoptosis en la RD están los **elevados niveles de glucosa** que activan una serie de proteínas involucradas en la muerte celular programada, incluyendo miembros de la familia de las caspasas, Bcl-2 y NF-kB (Allen et al., 2005; Madsen-Bouterse y Kowluru, 2008). Diferentes estudios describen la apoptosis en células del EPR, células gliales y pericitos retinianos inducida por elevados niveles de glucosa (Zeng et al., 2009; Zeng et al., 2010).

Por otro lado el **estrés oxidativo** está íntimamente relacionado con la apoptosis en la diabetes. El estrés oxidativo induce la expresión de moléculas pro-apoptóticas que dan lugar a la muerte celular. Se han demostrado episodios de apoptosis inducidos por estrés oxidativo que dan lugar a anomalías en la retina, cambios en los potenciales evocados visuales y los primeros cambios vasculares observados en la RD (Kowluru, 2005; Lopes de Faria et al., 2001).

Otros factores que se han descrito como causantes de apoptosis celular en la RD son la **excitotoxicidad por glutamato**, la **falta de factores de crecimiento** o la **inflamación** (Barber et al., 2011).

## 2.4 MARCADORES DE APOPTOSIS Y ESTRÉS OXIDATIVO

### 2.4.1 FAMILIA DE LAS CASPASAS

Las caspasas son un grupo de proteasas que son esenciales para mediar la apoptosis celular (Alnemri, 1997) y son muy sensibles al estrés oxidativo (Mohr et al., 1997). La disfunción mitocondrial inducida por ROS da lugar a la activación de la caspasa-9, que inicia la cascada de eventos que activa la caspasa-3, responsable de la fragmentación del ADN (Kristal et al., 1997).

La caspasa-3 al ser la caspasa ejecutora del daño celular es fundamental en el proceso de apoptosis y su detección se ha convertido en una herramienta muy fiable para identificar las células que van a morir por apoptosis (Stadelmann y Lassmann, 2000). Se ha observado que en la retina diabética existe una activación de la caspasa-3 y que tratamientos dirigidos a inhibir el desarrollo de RD en ratas diabéticas inhiben la activación de la caspasa-3 en retina. Esto sugiere que el aumento de estrés oxidativo puede modular la apoptosis en la diabetes a través de la vía de la caspasa-3.

### 2.4.2 FAMILIA DE LAS QUINASAS

Las vías de señalización que controlan la proliferación y muerte celular también involucran normalmente a las proteínas quinasas activadas por los mitógenos (mitogen-activated protein kinases (MAPK), que modulan la actividad de diferentes factores de transcripción por fosforilación. En mamíferos se han descrito 3 tipos principales de MAPK:

- 1) ERK 1-3 (quinasas extracelulares)
- 2) p38 kinases (alfa, beta, delta y gamma) también llamadas ERK 6
- 3) **JNK 1-3** (c-Jun-N-terminal quinasas)

Mientras que las ERKs son activadas sobre todo por factores de crecimiento y mitógenos y participan en la regulación del crecimiento, supervivencia y diferenciación celular (Dent et al., 2003), la JNK y p38k se activan por una variedad de estímulos designados colectivamente como "stress signals" o señales de estrés, promotores del estrés oxidativo como la exposición a la luz UV, cambios osmóticos o metabólicos, calor, isquemia y diferentes citoquinas (IL-1b, TNFa) (Westlund et al., 2009). La activación de las JNKs está fuertemente asociada a la apoptosis celular (Li T et al., 2002; Zwang y Yarden, 2006).

Las JNK juegan por lo tanto un papel central en la apoptosis celular desencadenada por estrés oxidativo. Recientemente se ha descrito como la inhibición de JNK produce una marcada reducción de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno. Esto puede ser útil para estudiar agentes que protejan al EPR del daño por estrés oxidativo (Ho TC et al., 2006).

## **3 SOMATOSTATINA**

### **3.1 RELACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO CON LA RD**

#### **3.1.1 HALLAZGOS INICIALES**

En 1953 Poulsen presentó un caso clínico que provocó un giro radical en los conceptos existentes hasta el momento sobre la patogenia de la RD (Poulsen, 1953). Su paciente, una embarazada con RDP presentó una regresión importante de su retinopatía tras haber sufrido una hemorragia hipofisaria al dar a luz y la RD se mantuvo estable hasta el momento de su muerte 15 años después (Poulsen, 1966).

A partir de ese momento se llevaron a cabo varios ensayos clínicos que confirmaron que la ablación hipofisaria podía mejorar la RD (Adams, 1974; Lundbaek, 1970) y los datos de estos ensayos indicaban que el éxito terapéutico se correlacionaba en concreto con la disminución de la hormona de crecimiento (GH) ya que al realizar una ablación hipofisaria y reemplazar todas las hormonas salvo la GH, el efecto sobre la RD era el mismo (Sharp et al., 1987; Wright et al., 1969).

Hasta finales de la década de 1970 no se documentó la eficacia de la fotocoagulación retiniana para el tratamiento de la RDP, lo que hizo que tras el caso clínico presentado por Poulsen la ablación iatrogénica de la hipófisis mediante cirugía o radiación fueran técnicas utilizadas para el tratamiento de la RDP severa, a pesar de los serios efectos secundarios que estas conllevaban (Kohner et al., 1976; Sharp et al., 1987; Wright et al., 1969).

En la actualidad la ablación de la hipófisis como tratamiento para la RD sólo tiene interés teórico e histórico debido a los efectos secundarios que produce y al desarrollo de nuevos tratamientos para la RD. No obstante, la implicación de la GH en la patogénesis de la RD ha abierto una nueva vía de investigación en busca de fármacos que inhiban de forma selectiva la secreción de GH para tratar la RDP, como por ejemplo la SST y sus análogos.

#### **3.1.2 HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH)**

La GH es una hormona peptídica sintetizada en la adenohipófisis que tiene una amplia variedad de funciones biológicas, siendo la principal de ellas la promoción del crecimiento y la regulación del metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Sus efectos biológicos se producen de forma directa o indirecta a través de factores producidos en el hígado y otros tejidos, siendo el más importante el IGF-1.

La regulación de la secreción de GH es compleja y depende del estímulo hipotalámico de GHRH (hormona liberadora de la GH), de la inhibición hipotalámica a través de la SST y del feed-back negativo

producido por IGF-1, existiendo además otros estímulos que pueden influir en su secreción como el ejercicio, el estrés o el sueño.

En la siguiente figura podemos ver un esquema del eje hipotálamo-hipófisis-GH.

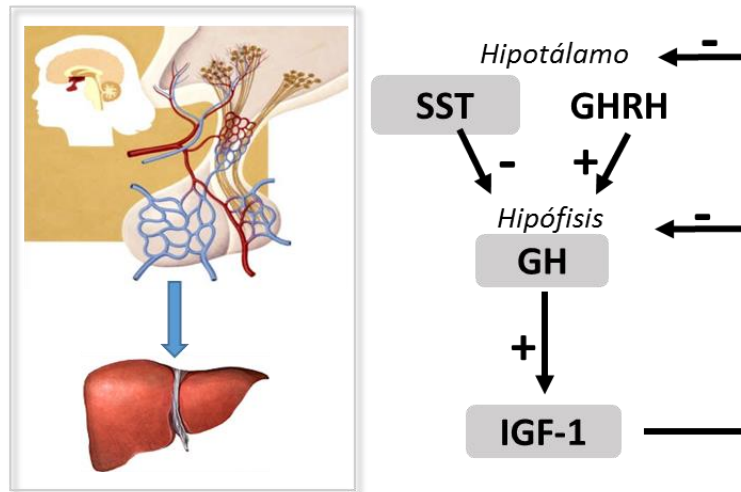


Figura 13. Esquema que representa las interacciones del eje hipotálamo-hipofisario-GH. SST: Somatostatina, GHRH: Hormona liberadora de la hormona del crecimiento, GH: Hormona del crecimiento, IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1.

### 3.1.3 GH Y RETINOPATÍA DIABÉTICA

Varias observaciones dieron lugar a que se postulara una relación entre la GH y el desarrollo de RD. La base de esta hipótesis incluye:

1. La RD se acelera durante la pubertad, cuando la sensibilidad de los tejidos a la GH está aumentada (Grant MB et al., 2000).
2. Pacientes diabéticos con hemocromatosis y destrucción infiltrativa de la hipófisis tienen poca afectación ocular por la diabetes. (Grant MB et al., 2000).
3. Pacientes diabéticos con enanismo hipofisario (déficit de GH) no tienen RD (Merimee, 1978).
4. Se ha observado un aumento de GH en diabéticos con mal control metabólico (Holly et al., 1988) en los que encontramos RD con más frecuencia.

Por otra parte varios estudios clínicos han correlacionado los niveles plasmáticos o intravítreos de GH e IGF-1 con la diabetes o la RD:

### **3.1.3.1 GH en plasma y diabetes**

La GH circulante tiene un efecto sobre el metabolismo de la glucosa, causando resistencia a la insulina con intolerancia a la glucosa, hiperglucemia y aumento de la necesidad de insulina (Rizza et al., 1982).

Se ha descrito que los diabéticos tipo I tienen niveles más elevados de GH circulante (Hansen y Johansen, 1970), sobretodo en periodos de mal control metabólico (Gerich et al., 1976). Estos niveles son mayores que en pacientes diabéticos bien controlados o pacientes controles sanos. (Orskov et al., 1968).

### **3.1.3.2 GH en vítreo y diabetes**

Del mismo modo se han encontrado niveles más elevados de GH y IGF-1 en vítreo en los pacientes diabéticos que en pacientes controles sanos. Se ha observado además como a mayor concentración intravítrea de GH y IGF-1 mayor es la actividad de la RD (Boulton et al., 1997; Grant M et al., 1986; Meyer-Schwickerath et al., 1993; Burgos et al., 2000).

### **3.1.3.3 GH, IGF-1 y angiogénesis**

Por otra parte varios estudios clínicos han correlacionado los niveles de IGF-1 con la progresión de la RD y el proceso de neovascularización retiniana:

- Merimey sus colaboradores encontraron un aumento de los niveles séricos de IGF-1 en un subgrupo de pacientes con RDP rápidamente progresiva (Merimee et al., 1983).
- En otro estudio prospectivo se observó un aumento de los niveles de IGF-1 sérico en el momento de la aparición de los neovasos, comparado con los niveles de IGF-1 3 meses antes de desarrollar la neovascularización que eran más bajos (Hyer et al., 1989).
- En un estudio poblacional de 928 diabéticos se observó que los niveles plasmáticos elevados de IGF-1 se correlacionaban con un aumento de la frecuencia de RDP (Dills et al., 1991).

Estudios experimentales indican también la importancia de GH e IGF-1 en la aparición de RD:

- La administración intravítrea de IGF-1 puede reproducir las anomalías microvasculares que encontramos en la RD (Danis y Bingaman, 1997; Grant MB et al., 1993).
- Es posible estimular la proliferación de células endoteliales retinianas humanas in vitro con la exposición a GH (Rymaszewski et al., 1991) y IGF-1 (Grant MB et al., 1990).
- La sobre-expresión de IGF-1 en ratones transgénicos normoglucémicos da lugar a anomalías retinianas vasculares y gliales incluyendo neovascularización, pudiendo estar por lo tanto implicado el IGF-1 en la fisiopatogénea de la RD (Ruberte et al., 2004; Smith et al., 1997).

- Es posible suprimir la angiogénesis al inhibir el receptor para IGF-1 en modelos experimentales de diabetes (Smith et al., 1997).

### **3.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA SOMATOSTATINA**

La implicación de la GH en la RD ha llevado a iniciar múltiples ensayos clínicos en busca de tratamientos dirigidos a inhibir esta hormona, siendo el principal de ellos la SST y sus análogos.

#### **3.2.1 MOLÉCULA DE SOMATOSTATINA**

La SST es una hormona hipotalámica polipeptídica ampliamente distribuida a lo largo del sistema nervioso, tracto gastrointestinal y páncreas (Patel, 1999).

Es sintetizada por células neuroendocrinas, inflamatorias e inmunes como un precursor de 116 aminoácidos llamado preprosomatostatina, que es fraccionado por una proteasa en prohormonaprosomatostatina (92 aminoácidos) y finalmente procesado en los dos péptidos biológicamente activos: SST-14 o SST-28 según tengan 14 o 28 aminoácidos (Dasgupta, 2004).

La SST inhibe la secreción de varias hormonas y factores de crecimiento entre los que se incluyen el GH, IGF-1, glucagón e insulina, (Gerich et al., 1974; Gerich et al., 1977), a la vez que modula múltiples funciones celulares (Donaldson y Dodson, 2003).

#### **3.2.2 SOMATOSTATINA EN LA RETINA**

Se ha encontrado SST en la retina de varias especies, incluyendo la humana, variando la expresión de SST-14 y SST-28 entre las diferentes especies. En la retina la SST se sintetiza en células amacrinas GABAérgicas, localizadas en la capa nuclear interna de la retina (Cervia D et al., 2008).

#### **3.2.3 RECEPTORES DE SOMATOSTATINA**

La SST ejerce su acción a través de receptores específicos situados en la superficie celular, que se expresan entre otros lugares, en el sistema nervioso central, las leptomeninges, la adenohipófisis, la mucosa gastrointestinal y las células endocrinas y exocrinas del páncreas (Hoyer et al., 1995). Se han identificado 5 subtipos de receptores de SST llamados sst-1 a sst-5, existiendo dos isoformas del receptor sst2: sst2a y sst2b.

También se han identificado receptores para SST en diferentes partes oculares como la córnea, humor acuoso, cristalino, vítreo, úvea, retina y tejidos intraorbitarios extraoculares (Klisovic et al., 2001).

En la retina humana se han localizado inmunohistoquímicamente los subtipos sst1 y sst2 a lo largo de todas las capas retinianas (Klisovic et al., 2001; van Hagen et al., 2000) y también en las células endoteliales de los vasos sanguíneos retinianos (Klisovic et al., 2001).

### 3.2.4 ANÁLOGOS DE LA SOMATOSTATINA

La SST natural ha sido aislada y utilizada de forma satisfactoria para inhibir la secreción de GH en humanos (Hall et al., 1973), pero su corta vida media en plasma de 2 a 3 minutos hace que no sea apropiada en la práctica clínica a largo plazo. Por ello se han sintetizado diferentes análogos de la molécula a partir de modificaciones en su estructura (Figura 14). Estas transformaciones le confieren al péptido una mayor estabilidad y tiempo de vida media (2-3 horas) preservando la actividad biológica de la molécula original. No obstante, puede variar el grado de afinidad de los análogos por los cinco receptores de la SST.

Se ha descrito que la inhibición de la secreción de GH es más sensible a los agonistas de sst2, mientras que la inhibición de la secreción de insulina está mediada principalmente a través de los receptores sst5, pudiendo seleccionar agonistas selectivos que sean útiles para modular la función endotelial sin alterar la secreción de insulina.

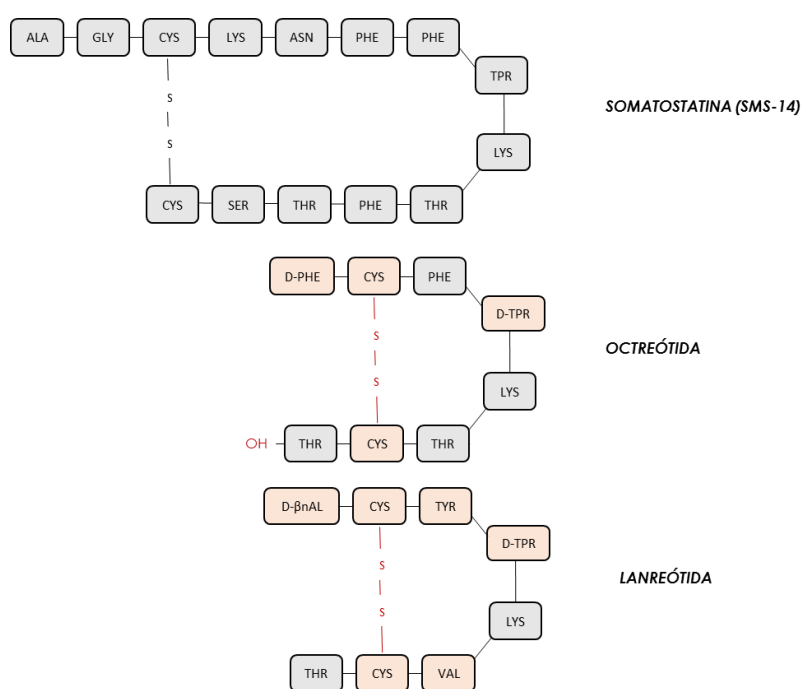


Figura 14. Composición de la SST y los análogos comercializados. Adaptado de Catalá M, 2005.

A continuación se detallan las características de los principales análogos de la SST.

#### 3.2.4.1 Octreotido

El octreótido (Sandostatin®, NovartisPharma) fue el primer análogo de la SST utilizado en la clínica (Lamberts et al, 1996). Su potencia en la inhibición de la secreción de GH es 45 veces mayor que la de la SST nativa. El octreótido se une a los receptores sst2, sst3 y sst5 (Hannon et al., 2002), sin embargo la

expresión retiniana de sst3 y sst5 es muy limitada (Thermos, 2003), por lo que las acciones del octreótido están mediadas por los receptores sst2.

### **3.2.4.2 Análogos de acción prolongada**

El octreótido en infusión continua es más eficaz para disminuir la secreción de GH que en régimen subcutáneo. Por otra parte la incomodidad para el paciente de la administración subcutánea que implica una aplicación 3 veces al día ha hecho que se desarrollen otros preparados de acción prolongada. Entre ellos están:

- **Octreótido LAR (Sandostatin LAR®)**
- **Lanreótido de liberación prolongada (Somatulina SR®)**
- **Lanreótido autogel (SomatulinaAutogel®)**

Las indicaciones aprobadas para la utilización de análogos de la SST por la Agencia Europea del Medicamento son el tratamiento a largo plazo de la acromegalia (Bevan et al., 2002) y los tumores gastroenteropáticos (Rohaizak y Farndon, 2002). Por lo que en la RD no está aprobado su uso y se utilizan como fármaco de uso compasivo.

### **3.2.5 MECANISMOS DE ACCIÓN**

La SST y sus análogos pueden mejorar la RD debido a las diferentes propiedades que se les han atribuido. Los diferentes mecanismos de acción se resumen en la figura 15.

#### **3.2.5.1 Acción antiangiogénica**

La angiogénesis se produce por un desequilibrio entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos como hemos descrito anteriormente. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la acción antiangiogénica de los análogos de la SST:

##### **1- Acción indirecta (sistémica):**

La SST y sus análogos son potentes inhibidores de la liberación sistémica de la GH, disminuyendo consecuentemente la producción de IGF-1 (ambos factores pro-angiogénicos). Inicialmente se atribuyó el papel antiangiogénico de la SST a este mecanismo, aunque hoy en día es controvertido (Boehm, 2007; García de la Torre et al., 2002; Wilkinson-Berka et al., 2006).

##### **2- Acción directa (local):**

Debido a que en la retina se sintetiza también SST y además se expresan allí sus receptores, se pensó que la SST podía de forma directa inhibir la cascada angiogénica:



- Al actuar la SST sobre los receptores retinianos se piensa que pueden iniciarse señales de transducción post-receptor que modifiquen la secreción de diferentes factores de crecimiento angiogénicos como el IGF-I, VEGF, EGF, bFGF y PDGF (Baldysiak-Figiel et al., 2004; Boehm, 2007; García de la Torre et al., 2002; Higgins et al., 2002).
- Al reducir el IGF-1 de forma local a través de receptores sst2 se inhibe también la secreción retiniana del VEGF inducida por IGF-1 (García De La Torre, 2002).
- Puesto que también se han encontrado receptores de SST en el endotelio de los vasos retinianos, también podría tener la SST un efecto directo antiproliferativo al activar los receptores. Se ha descrito que el octreotido puede inhibir la proliferación de células endoteliales al inhibir el IGF-1, bFGF y VEGF in vitro (Danesi et al., 1997; Lawnicka et al., 2000); Baldysiak-Figiel,2004; Grant MB et al., 1993).

Esta hipótesis de la acción local de la SST está apoyada además por una serie de estudios en los que se observó un déficit en los niveles intravítreos de SST en pacientes diabéticos y pacientes con EMD. (Hernández et al., 2005; Simó et al., 2002; Simó et al., 2007). Estos resultados sugieren que la SST puede desempeñar un papel importante en la homeostasis retiniana y que su déficit puede contribuir al proceso de neovascularización retiniana y desarrollo de EMD.

#### **3.2.5.2 Regulación de sistemas de transporte en el EPR**

En la parte apical del EPR se ha demostrado expresión de receptores de SST donde se ubican varios sistemas de transporte de fluido e iones (Lambooi et al., 2000). La SST puede regular el equilibrio del transporte de iones y fluidos, al activar estos receptores contribuyendo a reducir el EM y recuperar la función del EPR dañado (Carrasco et al., 2007).

#### **3.2.5.3 Acción anti-inflamatoria**

Esta teoría está basada en datos experimentales que demuestran que la SST y sus receptores están presentes en el tejido linfoide humano y que puede inhibir tanto la respuesta humoral como celular inmune (van Hagen et al., 1994). Esto puede explicar en parte la eficacia de la SST para tratar edemas maculares de origen inflamatorio.

#### **3.2.5.4 Efecto neuroprotector**

La SST y sus análogos pueden tener además un papel neuroprotector a través de varias vías incluyendo:

- Calcio intracelular (Petrucci et al., 2001)
- Sistema Óxido nítrico/GMPc (Mastrodinou et al., 2006)
- Dopamina (Kouvidi et al., 2006)
- Liberación de glutamato de los FR

Recientemente se ha descrito como la SST tóxica previene la neurodegeneración retiniana en ratas diabéticas a través de una reducción de los niveles de glutamato, prevención de la activación glial y modulación de señales proapoptóticas (Hernández et al., 2013).

### 3.2.5.5 Efectos sobre el ciclo celular y apoptosis

Las propiedades antiproliferativas de la SST pueden deberse también a la inducción de apoptosis.

Los receptores sst1, sst4 y sst5 modulan la vía de las MAPK que inducen la detención del ciclo celular en la fase G1. Por otra parte a través de los receptores sst2 y sst3 la SST promueve la apoptosis por diferentes mecanismos (Ferjoux et al., 2000; Davis et al., 2001).

La siguiente figura resume los mecanismos de acción de la SST.

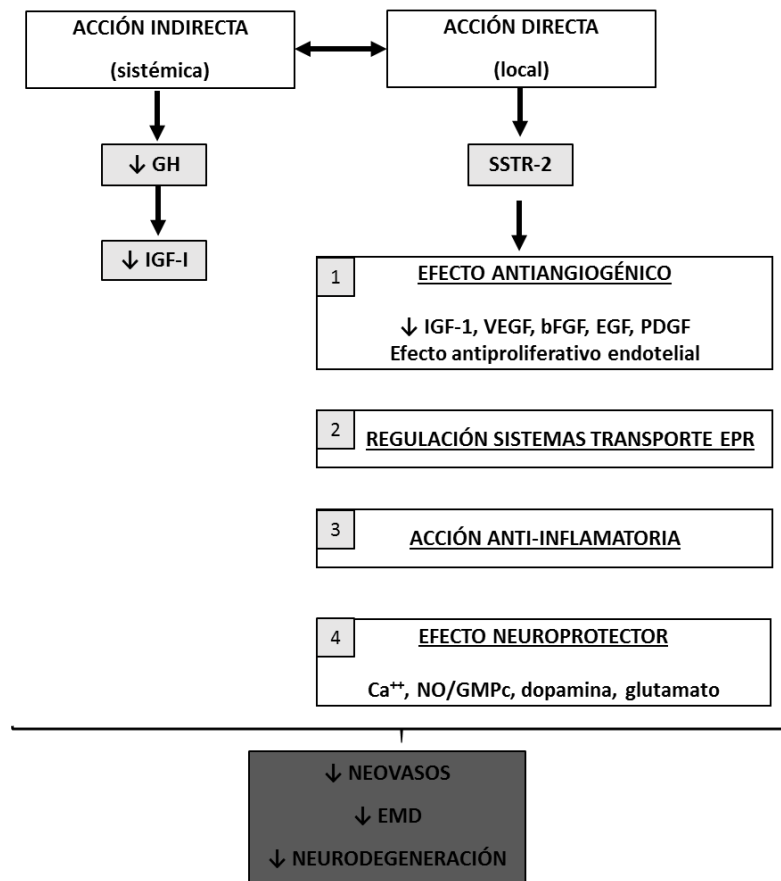


Figura 15. Esquema resumen de los mecanismos de acción de la SST.

### 3.3 APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS ANÁLOGOS DE LA SOMATOSTATINA EN OFTALMOLOGÍA

#### 3.3.1 RETINOPATÍA DIABÉTICA

Varios estudios han demostrado la eficacia del tratamiento de la RDP con análogos de la SST:

- McCombe y colaboradores administraron octreotido en bomba de infusión continua durante 4 semanas en 11 pacientes con RDP que no habían sido tratados previamente con láser. En todos los pacientes se detuvo la progresión de la RD durante el tratamiento y se observó una **regresión de la neovascularización y disminución de la exudación vascular** en la AGF en 2 pacientes. Se compararon con un grupo control de 6 pacientes con RDP tratados de forma convencional, en los que se observó progresión de la retinopatía en la mitad de ellos (McCombe, 1991).
- Se ha observado también una **mejoría de la AV** en 4 pacientes con RDP panfotocoagulados tratados con octreotido de acción prolongada entre 6 y 20 meses de en un ensayo clínico no controlado (Mallet et al., 1992).
- Grant y colaboradores realizaron un ensayo clínico aleatorizado que incluía: 11 pacientes con RDNP o RDP tratados con inyecciones subcutáneas de octreotido y 12 pacientes controles que recibían el tratamiento convencional para la RD. Sólo 1 ojo de 22 de los tratados con octreotido requirió PFC, comparado con 9 de 24 ojos controles con resultados estadísticamente significativos ( $p < 0,006$ ). La incidencia de progresión de la enfermedad a RDP severa fue de un 9% en pacientes tratados con octreotido y un 42% en pacientes controles durante los 15 meses de seguimiento aunque sin alcanzar la significancia estadística (Grant MB et al., 2000). El octreotido enlentece por tanto la progresión de la RD, **posponiendo el tiempo hasta que se necesite tratamiento con láser** en comparación con un grupo control.
- En 2001 se realizó otro ensayo prospectivo aleatorizado en 18 pacientes con RDP severa panfotocoagulados, 9 de ellos tratados con octreotido durante 36 meses y 9 controles. Durante los 3 años de seguimiento se observó una **disminución en la incidencia de hemovítreos y la necesidad de vitrectomías** de forma significativa en ( $p = 0,002$ ) en los pacientes tratados con octreotido. **La AV se preservó** y era significativamente mejor en los pacientes tratados con octreotido ( $P = 0,05$ ) (Boehm et al., 2001).

El grupo de Hernaez-Ortega estudió además la eficacia del octreótido (Hernaez-Ortega et al., 2004) y lanreótido (Hernaez-Ortega et al., 2008) para el tratamiento del EMD resistente al tratamiento estándar en tres pacientes. Se observó una **mejoría anatómica del EMD** en la OCT en todos los pacientes tratados. A pesar de que la AV no mejoró, probablemente debido al daño crónico de los FR, sí que los pacientes refirieron una **mejoría en el test de salud mental y función visual**.

### 3.3.2 EFECTOS DE LA SST SOBRE EL CONTROL DE LA DIABETES

Se ha observado también que la SST puede facilitar el control de la diabetes ya que al bloquear las hormonas contrainsulares como GH, glucagón y cortisol, da lugar a menos fluctuaciones de la glucemia. Además la administración de análogos de la SST en diabéticos tipo 1 da lugar a una disminución en la necesidad de insulina exógena (Gerich et al., 1974; Wahren, 1976).

### 3.3.3 OTRAS PATOLOGÍAS OCULARES

Diferentes trabajos avalan también la eficacia de los análogos de la SST para tratar el EM de otras etiologías diferentes a la RD:

- **EM idiopático** (Kuijpers et al., 1998; Rothova, 2002)
- **EM postquirúrgico** (Shah et al., 2010)
- **EM uveítico** (Kafkala et al., 2006; Missotten et al., 2007; Papadaki et al., 2005; van Hagen et al., 2000)
- **Distrofia macular cistoide dominante** (Hogewind et al., 2008)

Dadas las propiedades antiproliferativas, anti-inflamatorias y antiangiogénicas de los análogos de la SST y la presencia de sus receptores en prácticamente todos los tejidos oculares, se ha aplicado su uso también en otras patologías con resultados prometedores:

- **Degeneración macular asociada a la edad** (Palii et al., 2008; Papadaki et al., 2003; van Hagen et al., 2000)
- **Orbitopatía tiroidea** (Krassas et al., 2007)

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

A pesar de la introducción de los anti-VEGF y dispositivos de liberación prolongada de corticoides como tratamiento del EM, sigue existiendo un porcentaje de pacientes diabéticos que no responden a la medicación, desarrollando un EM crónico que compromete su función visual. Entre los nuevos tratamientos estudiados para EMD refractarios están los análogos de la SST, con los que el grupo de Hernaez-Ortega y colaboradores encontraron buenos resultados preliminares (Hernaez-Ortega, 2004; Hernaez-Ortega, 2008). A la vista de sus resultados quisimos estudiar más a fondo uno de los análogos más recientes (Somatulina Autogel®), tanto su mecanismo de acción como su efectividad en la práctica clínica.

Dado que el estudio del estrés oxidativo ha demostrado en los últimos años que podría ser un factor importante en el desarrollo de la RD (Brownlee, 2001), nos propusimos estudiar por una parte si entre los efectos de la Somatulina podría estar el ejercer algún efecto antioxidante y por otra parte tratar de aclarar su papel antiapoptótico que aún es controvertido. Abordamos un estudio experimental con la hipótesis de trabajo que la Somatulina puede modular los fenómenos del estrés oxidativo y apoptosis en la RD, pudiendo mejorar el pronóstico visual de los pacientes diabéticos con retinopatía. En la vertiente clínica el propósito fue realizar un estudio prospectivo para determinar la efectividad de la Somatulina para el tratamiento del EMD refractario a los tratamientos habituales basándonos en los resultados obtenidos por Hernaez-Ortega y colaboradores.

## 2 OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de investigación son:

1. Determinar el efecto de la Somatulina Autogel (S) sobre la expresión del **VEGF** en células humanas del EPR (ARPE-19) expuestas a alta o baja concentración de glucosa.
2. Determinar el efecto de la S sobre la apoptosis celular a través del marcador **caspasa 3** en células humanas del EPR (ARPE-19) expuestas a alta o baja concentración de glucosa.
3. Determinar el efecto de la S sobre el estrés oxidativo a través del marcador **JNK** en células humanas del EPR (ARPE-19) expuestas a alta o baja concentración de glucosa.
4. Determinar la relación entre el VGEF, JNK, caspasa-3 tras el efecto de la S en células humanas del EPR (ARPE-19) expuestas a alta o baja concentración de glucosa.

5. Estudiar la efectividad del tratamiento con S sobre el EMD refractario mediante los cambios en AV, espesor macular y electroretinograma (ERG).
6. Estudiar los posibles cambios en parámetros bioquímicos y tensión arterial en pacientes diabéticos tratados con S.
7. Estudiar los cambios en la función visual percibidos por los pacientes tratados con S mediante el cuestionario VF-14.

## MATERIAL Y MÉTODOS



# 1 ESTUDIO EXPERIMENTAL

## 1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL

En este trabajo se estudió el papel de la S en la regulación la angiogénesis, apoptosis y estrés oxidativo en cultivos de células de EPR humano que fueron tratadas con S. El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de la Fundación Oftalmológica del Mediterráneo (FOM, actualmente FISABIO-Oftalmología Médica), Valencia.

## 1.2 CULTIVOS CELULARES

### 1.2.1 MATERIAL UTILIZADO PARA LOS CULTIVOS CELULARES

A continuación se detalla el material de laboratorio utilizado en el presente trabajo para realizar los cultivos celulares.

#### 1.2.1.1 MATERIAL FUNGIBLE

- Placas Falcon de 15 y 50 ml
- Micropipetas de 20, 200 y 1000  $\mu$ l
- Pipetas de vidrio estéril de 5, 10y 25 ml
- Rotulador de vidrio
- Matraz T-25
- Puntas estériles de 20, 200 y 1000  $\mu$ l
- Dispensador automático de laboratorio

#### 1.2.1.2 APARATOS

- Microscopio invertido, modelo Axiovert 25, Zeiss
- Centrifugadora, modelo 5415 R; Eppendorf, Alemania
- Cámara Neubauer
- Incubadora, modelo HeraCell 150i CO<sub>2</sub> incubator Thermo Scientific

#### 1.2.1.3 REACTIVOS Y COLORANTES

- DMEM:Ham's F12 (1:1) = medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 de Ham mezclado con tampón HEPES 15mM, 1,2g/l bicarbonato sódico, 2,5mM L-glutamina y 0,5 mM piruvato sódico
- Suero fetal bovino (50ml/500ml)
- Penicilina (100U/ml)/Estreptomicina (100 $\mu$ g/ml )
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

- Fosfato buffer salino (PBS) estéril
- Hank's Balanced SALT solution sin calcio ni magnesio (HBSS) (Invitrogen)
- Trypan Blue
- Etanol al 70%
- Tripsina-EDTA (tripsina al 0,05% y EDTA al 0,02%)
- Glucosa 2,49M
- Manitol 40mM

#### **1.2.1.4 CÉLULAS DE EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA (ARPE-19)**

En el presente estudio se utilizaron células humanas de EPR de la línea celular ARPE-19 (ATCC número CRL-2302), que obtuvimos de LGC Promochem Standards.

Esta línea celular fue derivada en 1986 por Amy Aotaki-Keen de los ojos de un varón de 19 años que falleció en un accidente de tráfico. Las células expresan los marcadores CRALBP y RPE-65 específicos de las células epiteliales del EPR y forman monocapas estables que exhiben polaridad morfológica y funcional.

En 1996 Dunn describió que cumplen las propiedades estructurales y funcionales características de las células de EPR in vivo, por lo que ha sido ampliamente utilizada en estudios in vitro para evaluar la fisiología del EPR (Dunn et al, 1996).

#### **1.2.2 ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO CELULAR**

La línea celular ARPE-19 se estableció con 20 pases celulares hasta obtener una monocapa de células cúbicas. Los pases se realizaron periódicamente manteniendo las células en un medio de cultivo formado por DMEM: Ham's F12 1:1 suplementado con un 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina.

Las células se incubaron en matraces de 25cm<sup>2</sup> a 37° C con un aporte constante de 5% de dióxido de carbono. El medio de cultivo fue cambiado entre dos y tres veces a la semana.

Al inicio del establecimiento se realizaron las criopreservaciones para posteriores experimentos utilizando un medio de congelación constituido por 50% de PBS, 40% medio DMEM-Ham's F12 y 10% de DMSO, como viene establecido en el protocolo de esta línea celular.

#### **1.2.3 PASES CELULARES**

Al ser un cultivo de células adherentes, para subcultivar las células, se sometieron a una tripsinación selectiva. Para ello se realizó el siguiente proceso:

1. Atemperar a 37° el medio de cultivo y la tripsina.
2. Eliminar el medio de cultivo del matraz.

3. Lavar dos o tres veces con 5-10 ml de PBS estéril para eliminar los restos de suero y evitar así que el suero pudiera inhibir la tripsina.
4. Eliminar el PBS del matraz.
5. Añadir 2 ml de tripsina al 0,05% y EDTA al 0,02% en HBSS durante 5 a 10 minutos en la incubadora a 37°. De este modo, las células se van despegando, pudiéndose observar cómo se van levantando en el microscopio invertido, proceso que dura entre 5 y 15 minutos.
6. Añadir 8 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina, alcanzando un total de 10 ml.
7. Para eliminar la solución de tripsina, se centrifuga la suspensión 5 minutos a 500g. Se elimina el sobrenadante y resuspenden las células en 1-3 ml de medio de cultivo, dependiendo de la densidad celular.

A continuación se valora el número de células disponibles, antes de sembrarlas. Para ello se realizó el conteo de las células en una cámara de Neubauer. El protocolo empleado para ello fue el siguiente:

1. Coger 20 µl de la solución de células y 20 µl de Trypan Blue.
2. Colocar 10 µl de la mezcla anterior en la cámara de Neubauer.
3. Se cuentan los cuatro cuadrantes de los extremos, contando 16 cuadrados de cada cuadrante y descartando las células que se quedan sobre las líneas de los cuadrantes (Figura 16). Se cuentan las células que sean refringentes y se descartan las azules.
4. La fórmula empleada para valorar el número de células es la siguiente:

$$\text{Células por } \mu\text{l} = \text{Células contadas} / \text{n}^{\circ} \text{ cuadrantes} \times 2 \times 10^4$$

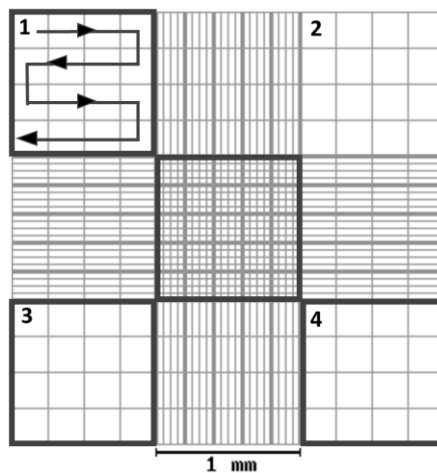


Figura 16. Método de conteo celular empleando la cámara de Neubauer

A continuación sembramos las células en diferentes matraces de 25cm<sup>2</sup> a una dilución de 1:3 a 1:5. Se recomienda una densidad celular entre 2-4 x 10<sup>4</sup> cels/cm<sup>2</sup>. Por último incubamos los cultivos a 37°C con un aporte de 5% de CO<sub>2</sub>.

Cambiamos el medio de cultivo repitiendo todo el proceso anterior de 2 a 3 veces por semana. Después de unos 20 pases celulares, obtenemos una monocapa de células cúbicas.

La morfología, viabilidad y porcentaje de confluencia de las células en este ensayo se evaluó diariamente en los diferentes grupos mediante la observación microscópica.

#### 1.2.4 TRATAMIENTO CON GLUCOSA DE LAS CÉLULAS ARPE-19

Para simular a las células del EPR diabéticas, cuando se completaron los 20 pases celulares, los cultivos fueron expuestos a un medio de alta concentración (45mM) o baja concentración (5mM) de glucosa durante 7 días para crear los siguientes grupos:

- Grupo diabéticos: 45 mM glucosa
- Grupo controles: 5 mM glucosa + 40 mM manitol

La preparación de las concentraciones para cada uno de los medios de cultivo se realizó de la siguiente manera:

- Medio con glucosa 45 mM:  
Diluir 0,9 ml de solución de glucosa 2,49 M en 50 ml de medio de cultivo.
- Medio con glucosa 5 mM:  
Diluir 100 µl de solución de glucosa 2,49 M en 50 ml de medio de cultivo.
- Medio con Manitol 40 mM:  
Diluir 0,73 g de manitol en 100 ml de medio de cultivo.

El medio de cultivo se cambió cada 2 días.

#### 1.2.5 TRATAMIENTO CON SOMATULINA DE LAS CÉLULAS ARPE-19

Una vez preparados los dos grupos de cultivos: diabéticos y controles, iniciamos el tratamiento con S en cada uno de los grupos, estableciendo al final 4 grupos diferentes (Figura 17):

<b>Grupo 1</b>	Controles no tratados (C)
<b>Grupo 2</b>	Controles tratados con somatulina (C+SOM)
<b>Grupo 3</b>	Diabéticos no tratados (D)
<b>Grupo 4</b>	Diabéticos tratados con somatulina (D+SOM)

Figura 17. Esquema que representa los cuatro grupos de cultivos celulares establecidos en el estudio.

La Somatulina fue suministrada por la empresa Ipsen Pharma. Se comercializa en forma de solución inyectable en jeringa precargada y contiene 90 mg de acetato de lanreotido, análogo de la SST de liberación sostenida.

Para evaluar una dosis respuesta de la Somatulina y encontrar una concentración efecto en las ARPE-19, se diluyó la S a diferentes concentraciones (1/100, 1/1000 y 1/10000). Se mantuvieron los cultivos 3 días con las diferentes concentraciones de Somatulina y se tomaron muestras a las 6, 24 y 48 horas. Se valoró el porcentaje de muerte celular por el MMT assay y se determinó la dosis a usar para los cultivos (1/1000). Se observó un efecto máximo a las 24 horas para esa concentración. Por ello los estudios inmunohistoquímicos se realizaron con la dosis efecto y se tomó la muestra para el análisis a las 24 horas de la administración de la Somatulina.

La siguiente figura representa un resumen del ensayo para el grupo 4, en los restantes grupos se siguió el mismo protocolo sin incluir los pasos correspondientes (añadido de glucosa y/o S).

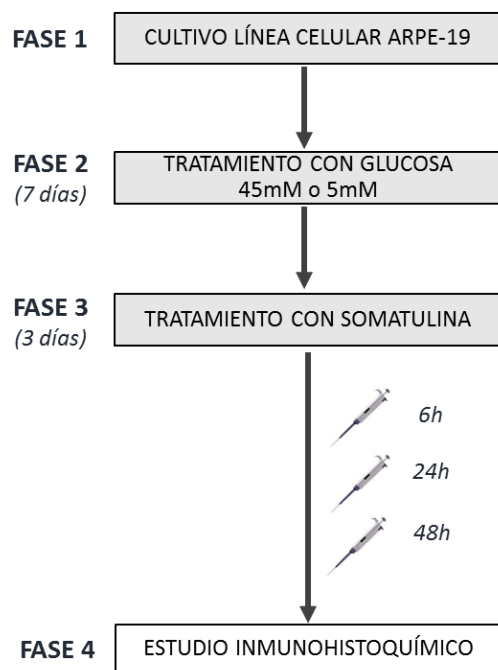


Figura 18. Esquema de las diferentes fases que constituyeron el presente ensayo, para el grupo de células tratadas con glucosa y somatulina.

### 1.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

#### 1.3.1 PARÁMETROS DE ESTUDIO

Mediante el estudio inmunohistoquímico se analizaron los siguientes parámetros, descritos en la introducción:

- Marcador de angiogénesis: **VEGF**
- Marcador de apoptosis: **Caspasa-3**
- Marcador de estrés oxidativo: **JNK**

Los protocolos de laboratorio seguidos para su determinación se describen a continuación.

#### 1.3.2 TECNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

**Técnica de inmunoperoxidasa:** Para ello empleamos dos Ac. En un primer paso se utiliza un Ac primario no marcado que se une al antígeno que queremos detectar y en una segunda fase un Ac secundario marcado que reacciona de forma específica con el Ac primario, quedando así ambos fijados a la localización del antígeno. En esta técnica se utiliza como marcador el enzima peroxidasa que mediante su unión a un sustrato y un agente cromógeno es capaz de convertir el sustrato incoloro en un sustrato de color marrón pardo haciendo visible la reacción al microscopio.

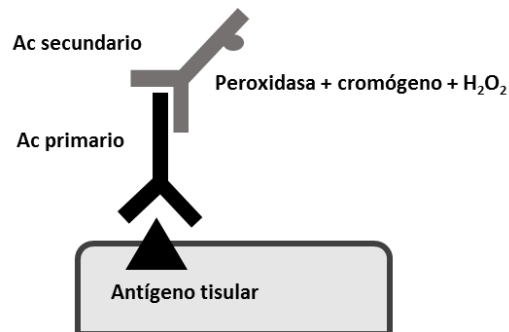


Figura 19. Esquema que representa la técnica de inmunoperoxidasa. La enzima se acopla al Ac secundario que se une al complejo antígeno-Ac primario.

#### 1.3.3 MATERIAL UTILIZADO PARA LA INMUNOHISTOQUÍMICA

##### 1.3.3.1 MATERIAL FUNGIBLE DE LABORATORIO

- Portaobjetos y cubreobjetos de vidrio estándar y aptos para microscopía de fluorescencia
- Frascos para fijación histológica

### **1.3.3.2 APARATOS**

- Microscopio de fluorescencia (modelo DM5000B; Leica Microsystems, Peterborough, Reino Unido)
- Microtomo de rotación (modelo RM2235; Leica Microsystems, Peterborough, Reino Unido)
- Agitador vórtex (modelo G560; Scientific Industries Inc., Nueva York, EE.UU.)
- Inmunoteñidor automático (modelo Benchmark classic; Ventana Medical Systems Inc., Tucson, EE.UU.)

### **1.3.3.3 REACTIVOS DE LABORATORIO**

- Formol al 4%
- Parafina (Paraplast Plus; Leica microsystems, Wetzlar, Alemania)
- Xilol (Química Clínica Aplicada S. A., Tarragona, España)
- Soluciones alcohólicas: etanol de diversa graduación para la deshidratación (Química Clínica Aplicada S. A., Tarragona, España)
- Agua destilada (S. Marí S. L., Ribarroja del Turia, Valencia, España)
- Colorantes para tinción histológica: hematoxilina (Merck; Darmstadt, Alemania) y eosina (Química Clínica Aplicada S. A., Tarragona, España)
- Sales y detergentes para soluciones:
  - CC1- Cell Conditioning 1: solución tampón Tris-base de pH básico (solución del kit comercial)
  - CC2- Cell Conditioning 2: solución tampón citrato pH ácido (solución del kit comercial)
  - Ez-Prep: solución comercial del proceso de auto-inmunotinción «BENCHMARK Series» para desparafinar durante la reacción inmunohistoquímica
  - Reaction Buffer: solución tampón de lavado para las preparaciones de inmunohistoquímica en los diferentes pasos del protocolo
  - Liquid coverslip (LCS): solución comercial para mantener el tejido hidratado durante el proceso de inmunotinción

### **1.3.3.4 REACTIVOS Y ANTICUERPOS PARA PROTOCOLOS DE HISTOLOGÍA**

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-caspasa-3 (Clon 3CSP03; Thermo Scientific, Cheshire; Reino Unido)
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGF (clon Ab-7; Thermo Scientific, Cheshire, Reino Unido)
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-JKN (Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185. Cell Signaling)
- Revelado de inmunohistoquímica: Kit de detección ultraView universal DAB (diaminobencidina). (Roche Diagnostics, Indianapolis, EE. UU./Ventana Medical SystemsInc., Tucson, Arizona, USA) que contiene los siguientes reactivos:

- Ultra V block
  - Hydrogen Peroxide Block
  - UltraVision ONE HRP Polymer
  - DAB Plus Substrate
  - DAB Plus Chromogen
- Medio de montaje Eukitt (Eukitt, Freiburg; Alemania)

### **1.3.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

#### **1.3.4.1 FIJACIÓN Y CORTE**

El protocolo que seguimos para la inclusión y corte de las muestras fue el siguiente:

1. Sumergir en formol al 4% 2 horas y lavar
2. Sumergir en formol al 4% 1 horas
3. Lavado en alcohol etílico al 70° 1 hora
4. Lavado en alcohol etílico al 96° 1 hora y lavar
5. Lavado en alcohol etílico al 96° 1 hora
6. Lavado en alcohol etílico al 100° 1 hora y lavar
7. Lavado en alcohol etílico al 100° 1 hora y 30 minutos
8. Sumergir en xilol 1 hora y 30 minutos lavar
9. Sumergir en xilol 1 hora y lavar
10. Sumergir en xilol 1 hora
11. Sumergir en parafina 1 hora y lavar
12. Sumergir en parafina 1 hora y 30 minutos

Las muestras se cortaron utilizando un microtomo de rotación (modelo RM2235; Leica Microsystems), obteniendo cortes de 3-5  $\mu\text{m}$ .

#### **1.3.4.2 TINCIÓN DE LOS CORTES CON HEMATOXILINA-EOSINA**

La tinción de los cortes con hematoxilina-eosina se realizó como se expone a continuación:

1. Desparafinar sumergiendo en xilol durante 15 minutos.
2. Lavar con alcohol etílico al 100° durante 10 minutos.
3. Lavar con alcohol etílico al 96° durante 3 minutos.
4. Lavar con agua destilada.
5. Sumergir en solución colorante de hematoxilina durante 5 minutos.
6. Lavar con agua destilada.
7. Pase rápido con alcohol clorhídrico al 0,5 %.



8. Lavar con agua destilada.
9. Pase rápido con agua amoniacal.
10. Sumergir en solución colorante de eosina durante 1 minuto.
11. Sumergir 1 minuto en etanol absoluto.
12. Lavar con agua destilada.
13. Deshidratar, aclarar y montar en el medio de montaje Eukitt.

### 1.3.5 PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Todas las tinciones se realizaron utilizando el inmunoteñidor automático Benchmark Classic y el estudio inmunohistoquímico de los cortes se realizó siguiendo el protocolo del producto LabVision (UltraVision ONE Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen; Thermo Scientific, Cheshire, Reino Unido) que se detalla a continuación:

1. Desparafinar y rehidratar cada corte de tejido. Esto se consigue realizando diversos baños en xilol y etanol en concentraciones decrecientes de forma sucesiva.
2. Lavar 2 veces en solución tampón.
3. Si es necesario, incubar el tejido con una enzima digestiva (desemascaramiento) apropiada que exponga el antígeno deseado (Tabla 8) ya que el proceso de fijación del tejido produce puentes metilo cruzados que unen proteínas entre sí, ocultando así muchos antígenos.
4. Lavar 4 veces en solución tampón.
5. Para reducir la tinción no específica de fondo debida a la presencia de peroxidasa endógena incubar la sección con el reactivo del kit "Hydrogen Peroxide Block" durante 10-15 minutos.
6. Lavar 4 veces en solución tampón.
7. Aplicar el reactivo "Ultra V Block" durante 5 minutos a temperatura ambiente para bloquear cualquier tinción de fondo inespecífica.
8. Lavar en solución tampón.
9. Aplicar el **Ac primario** e incubar según el protocolo recomendado por el fabricante de cada anticuerpo (Tabla 8).
10. Lavar 4 veces en solución tampón.
11. Aplicar el reactivo "UltraVision ONE HRP Polymer" (**Ac secundario conjugado con peroxidasa**) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente evitando su exposición a la luz. El Ac primario se une así a un Ac secundario universal que lleva acoplada la enzima peroxidasa.
12. Lavar 4 veces en solución tampón.
13. Añadir 40 µl de "DAB Plus Chromogen" a 2ml de "DAB Plus Substrate", mezclar y aplicar al tejido. Incubar durante 5-15 minutos, dependiendo de la intensidad de teñido que se quiera conseguir. De esta forma se añade el sustrato y cromógeno de la enzima peroxidasa. El sustrato incoloro se teñirá de color marrón pardo lo que permitirá su detección bajo el microscopio.

14. Lavar 4 veces en agua destilada.
15. Deshidratar y aclarar con xilol antes del montaje.
16. Cubrir con un cubreobjetos usando un medio de montaje permanente.

Este procedimiento general se ajusta para cada tipo de antígeno y Ac primario utilizado como viene especificado en la tabla 8, variando los tiempos de incubación y dilución, así como la necesidad o no de realizar el paso de desenmascaramiento (paso 3 del protocolo).

Anticuerpo Anti-	Dilución	Tiempo de incubación (min)	Desenmascaramiento*	Tiempo de desenmascaramiento (min)
<b>VEGF</b>	1:100	20	CC1	30
<b>Caspasa-3</b>	1:50	28	CC2	30
<b>JNK</b>	1:100	20	CC1	30

Tabla 8. Protocolos de inmunohistoquímica para los distintos Ac utilizados en este estudio.

\*CC1 y CC2 son diferentes soluciones acondicionadoras (ver apartado 1.3.3.3.)

El análisis de microscopía óptica de las muestras se efectuó con un microscopio Leica DM5000B. Las fotografías se tomaron con una cámara fotográfica digital Olympus OM101 acoplada al microscopio.

## 1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el apartado de resultados, los datos recogidos se expresan como media aritmética  $\pm$  desviación estándar.

Las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron mediante el test de t de Student para datos no pareados. Esta prueba se aplica cuando queremos comparar las medias de dos muestras de estudio independientes, como por ejemplo comparar los valores del VEGF en los grupos diabéticos sin tratar o tratados con S. Las correlaciones existentes entre los diferentes marcadores estudiados se determinaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

El nivel de significatividad empleado en todos los análisis ha sido el de 5% ( $\alpha=0.05$ ). Cualquier p-valor menor de 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Por el contrario, un p-valor mayor o igual a 0.05 indica ausencia de relación.

El programa utilizado para todos los análisis fue el paquete SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.).

## 2 ESTUDIO CLÍNICO

### 2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo no controlado de pacientes con EMD refractario a la terapia habitual (fotocagulación láser, anti-VEGF, corticoides o vitrectomía) que fueron tratados en nuestro centro en uso compasivo con inyecciones subcutáneas de 90 mg de Somatulina Autogel® cada cuatro semanas durante un año.

Para evaluar la eficacia del tratamiento se realizaron las siguientes pruebas:

- Toma de la **AV** mediante la escala de ETDRS para valorar la ganancia visual.
- **Tomografía de Coherencia Óptica** utilizando Cirrus-OCT y Stratus-OCT de Zeiss para evaluar los cambios anatómicos (cambios en el grosor macular central, volumen macular y volumen foveolar).
- **Electrorretinograma** (ERG) de tipo *Pattern* y *Multifocal* con el fin de determinar posibles cambios electrofisiológicos (cambios en la latencia y amplitud de respuesta).
- **Cuestionario específico de función visual (VF14)** para valorar la calidad de vida del paciente.

Durante el año de seguimiento se realizaron también:

- **Analíticas sanguíneas** para valorar la presencia de cambios en la glucemia, el control metabólico y perfil lipídico, **análisis de orina** y toma de la **tensión arterial**.
- Controles sobre posibles **efectos adversos** locales y sistémicos para valorar la seguridad del fármaco.

Los controles de los pacientes se realizaron a los 3, 6 y 12 meses. En todas las visitas se realizó la toma de la AV, la exploración oftalmológica, OCT, analíticas sanguínea y de orina, tensión arterial y registro de efectos adversos. El ERG y el cuestionario de función visual se realizaron únicamente en la visita basal pre-inclusión y la visita de los 12 meses. Antes del primer control postbasal de los 3 meses se realizaron controles al primer y segundo mes para evaluar la presencia de efectos adversos locales y sistémicos. Si en este tiempo el paciente refería efectos adversos sistémicos importantes que dificultasen su ritmo de vida habitual, se excluía al paciente del protocolo.

La siguiente tabla resume el diseño del estudio para cada una de las visitas:

Visita (Mes)	PRE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Consentimiento informado	x												
Revisión de inclusión/exclusión	x	x	x										
Datos demográficos	x												
Antecedentes médicos	x												
Medicación concomitante	x												
AGF													
Analítica sanguínea, orina y TA	x			x			x						x
AV	x	x	x	x			x						x
OCT	x			x			x						x
Exploración oftálmica	x	x	x	x			x						x
ERG	x												x
Cuestionario VF-14	x												x
Administración de la medicación	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Registro de efectos adversos	x	x	x	x			x						x

Tabla 9. Resumen de las pruebas realizadas en cada una de las visitas del estudio.

## 2.2 ENTORNO Y MATERIAL UTILIZADO

El estudio clínico ha sido realizado íntegramente en FISABIO Oftalmología Médica (FOM). Para ello hemos contado con las siguientes estancias, personal y material:

### 2.2.1 ESTANCIAS

- Consultas equipadas para realizar la exploración oftalmológica del paciente y para la realización de las diferentes pruebas.
- Consulta de enfermería para realizar las analíticas y administrar la medicación.
- Farmacia hospitalaria para la conservación de la medicación usada en el estudio.

### 2.2.2 PERSONAL

- Médicos oftalmólogos especializados en retina.
- Farmacéutica.
- Optometristas certificadas para tomar la AV con el sistema ETDRS y realizar las OCTs.
- Enfermeras de consulta para la extracción de la analítica sanguínea, toma de tensión arterial y administración de la medicación.
- Electrofisiólogo para la realización de los ERG.

### 2.2.3 MATERIAL

- Unidad de refracción IS-600N (Topcon) y optotipos ETDRS adecuados a las normativas para la toma de la AV en ensayos clínicos.

- Lámpara de hendidura (Topcon).
- Lentes de aumento de 90 y 22 dioptrías (Volk) para exploración de fondo de ojo.
- Tomógrafos de Coherencia Óptica (Cirrus y Stratus de Zeiss).
- Equipo electrorretinografía (Roland Consult® con software RETIsan 3.20/RETIport 32, campana Ganzfeld modelo Q450HF, monitor de 20 pulgadas CRC de SONY® modelo CPDE530).
- Soporte fotográfico de Topcon con el sistema Imagenet para realizar estudio angiográfico en la visita de pre-inclusión.
- Medicación: Somatulina Autogel® (Ipsen Pharma).
- Cuestionarios (1A, 1B, 1C, 1D y 2) además de la historia clínica en soporte informático, propia de la FOM para la recogida de datos.

### **2.3 MUESTRA Y SELECCIÓN DE PACIENTES**

La población muestral se compone de pacientes diabéticos atendidos en la FOM entre 2008 y 2009 diagnosticados de EMD en al menos uno de los ojos, que no responda al tratamiento estándar (fotocoagulación con láser, inyecciones intravítreas de anti-VEGF o corticoides y/o vitrectomía).

A continuación se detallan los criterios de inclusión y exclusión para la selección de los pacientes:

#### **2.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes con DM Tipo 2 atendidos en la FOM
- Ambos sexos
- Mayor de 18 años, sin límite de edad
- Diagnosticados en la FOM de EMD en al menos un ojo que no responde a tratamiento estándar

#### **2.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Paciente que se encuentre en tratamiento con otro análogo de la SST por la misma indicación.
- Paciente con embarazo o alto riesgo de embarazo.
- Paciente con antecedentes personales de cólico biliar.
- Paciente con riesgo cardiovascular alto (historia el último año de accidente vascular cerebral y/o infarto de miocardio).
- Paciente con insuficiencia renal y/o hepatopatía grave.
- Paciente que haya experimentado cirugía de cataratas en los 3 meses previos en alguno de los ojos.
- Paciente diagnosticado de catarata subcapsular posterior (LOCS > II-III).
- Paciente con isquemia macular (zona avascular foveolar > 50%).

Todos los pacientes fueron conocedores del tratamiento al que iban a ser sometidos, firmando el consentimiento informado correspondiente (ver anexos) al inicio del estudio. El paciente, podía además suspender su participación en el estudio en cualquier momento que lo deseara. Por otro lado el investigador podía decidir según su criterio la retirada de un paciente del seguimiento a lo largo del transcurso del estudio, si este no cumplía las normas del protocolo o si lo considerara necesario para el bienestar del paciente por aparición de acontecimientos adversos graves. Según las normas del protocolo, el motivo de la retirada de un paciente del estudio debía anotarse en el cuaderno de datos, para dejar constancia escrita de ello. Los pacientes que salieran fuera del estudio no iban a ser remplazados por nuevos pacientes a lo largo del estudio.

A los pacientes que cumplieren los criterios de inclusión y ninguno de exclusión se completó la visita de pre-inclusión de la siguiente manera:

#### **2.4 CONTROL PREINCLUSIÓN**

Se realizó una anamnesis detallada que incluía los siguientes datos y exploraciones, recogidos en el **cuestionario 1A** (ver anexos):

- Edad, sexo, peso, talla.
- Antecedentes patológicos, medicación habitual.
- Tipo de DM, tratamiento de la DM, tiempo de evolución.
- Presión arterial sistólica y diastólica.
- Análítica sanguínea con las siguientes determinaciones: glucemia en ayunas, insulinemia, hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol total, HLD colesterol, LDL colesterol, triglicéridos, IGF1 y creatinina.
- Análítica orina para medir la albuminuria y creatinuria.
- Electrorretinogramas pattern y multifocal.
- Ecografía biliar para recoger información sobre el estado de las vías biliares y determinar la presencia de cálculos, que serían motivo de exclusión (puesto que la Somatulina puede reducir la motilidad de la vesícula biliar y favorecer la formación de cálculos biliares).

Además se realizó una exploración oftalmológica completa que incluía:

- Exploración fundoscópica para explorar la retina de ambos ojos y determinar la presencia de RD, clasificándola en leve, moderada, severa, muy severa o proliferativa, así como certificando la presencia o no de edema macular siguiendo la *Clasificación clínica internacional de la RD* y la *Clasificación Internacional del Edema Macular* (Wilkinson CP, 2003) (Ver tablas 2 y 3).
- AGF macular para evaluar el comportamiento angiográfico del edema macular y descartar la presencia de isquemia macular mayor al 50%, que se consideraba criterio de exclusión.
- Registro de los tratamientos previos recibidos para la RD en cada paciente.
- Biomicroscopía con lámpara de hendidura para descartar la presencia de otra patología ocular.

Todo ello se recogió en el **cuestionario 1B** (ver anexos).

## 2.5 EXPLORACIÓN OFTALMOLOGICA

### 2.5.1 AGUDEZA VISUAL

En todas las visitas del paciente se ha determinado la mejor AV corregida (MAVC) siguiendo la escala del ETDRS (adaptada de Ferris, 1982). Para ello se utilizan optotipos de ETDRS bajo condiciones estandarizadas de luz fotópica de 85 cd/m<sup>2</sup> (candelas/metro<sup>2</sup>) de luminancia y a 4 metros de distancia. Se contabiliza el número máximo de letras leídas correctamente a dicha distancia de forma monocular. Si el número de letras leídas correctamente fuera inferior a 5, se reduciría la distancia a 1 metro. El número de letras leídas correctamente con cada ojo se anotó en el **cuestionario 1C**, así como la AV en fracción decimal.

### 2.5.2 TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA

En cada visita del estudio salvo las visitas del mes 1 y 2 (exclusivas para monitorizar efectos adversos) se realizó una OCT para confirmar y cuantificar la presencia de EMD en ambos ojos. Para ello utilizamos dos modelos de OCT:

#### 2.5.2.1 *Cirrus-OCT (Zeiss)*

Se realizaron los siguientes exámenes para obtener mapas de volúmenes, mapa de espesores y tablas con datos numéricos:

- *Macular cube 512x128*
- *Five Line Raster*

De ellos se recogió el grosor macular central medio (medido en  $\mu\text{m}$ ) y el volumen macular (medido en  $\text{mm}^3$ ).

#### 2.5.2.2 *Stratus-OCT (Zeiss)*

Con la Stratus-OCT se realizaron los siguientes análisis:

- *Fast Macular Thickness Map*: Recogiendo los datos del volumen foveolar y volumen macular total (en  $\text{mm}^3$ ).
- *6mm Cross-hair scan*: Tomando el valor del grosor foveolar medio (en  $\mu\text{m}$ ).

### 2.5.3 ELECTORREGINOGRAMA (ERG)

En las visitas de preinclusión y la visita de los 12 meses se realizó un ERG utilizando un equipo Roland en las siguientes modalidades:

### **2.5.3.1 ERG Pattern**

El ERG Pattern estudia la respuesta obtenida al estimular la retina con un patrón geométrico, tipo damero, reversible, blanco y negro, con características de contraste y luminancia controladas y con un punto de fijación central. La prueba se realizó binocularmente, sin midriasis y con la refracción adecuada a la distancia de la pantalla. Se colocan 2 electrodos en la conjuntiva bulbar inferior, 2 electrodos de referencia en el canto externo de cada ojo y un electrodo masa en la frente.

La respuesta consta de un componente positivo a unos 50 ms (P50) seguido de uno negativo a 95 ms (N95) y precedido de otro pequeño negativo a 30-35 ms (N35). De cada ERG Pattern registramos la **latencia** de P50 (ms) y la **amplitud** desde P50 a N95( $\mu$ V) de cada ojo.

### **2.5.3.2 ERG Multifocal.**

El ERG Multifocal consiste en la estimulación simultánea de diferentes áreas de la retina permitiendo la obtención de un mapa topográfico de la respuesta de los 30 grados centrales de la retina. La prueba se realiza en midriasis y condiciones fotópicas con los mismos electrodos que en el ERG Pattern. El estímulo se presenta en una pantalla de luminancia constante dividida en 103 hexágonos, de mayor superficie cuanto más periféricos, que alternan de blanco a negro de forma randomizada.

Se registró la densidad de respuesta por unidad de superficie (**amplitud media**) de los 6 anillos concéntricos perifoveolares medidos en nV/grados<sup>2</sup>, siendo el 1 el más central y el 6 el más periférico.

Los resultados tanto del ERG como de las OCTs se transcribieron en el **questionario 1D** (ver anexos).

## **2.6 OTRAS EXPLORACIONES**

### **2.6.1 ANALÍTICA SANGUÍNEA, TENSIÓN ARTERIAL**

En todas las visitas con el fin de evaluar la potencial modificación por la somatulina de otros factores de riesgo para la RD, se realizó toma de tensión arterial, analítica sanguínea y analítica de orina.

En la analítica sanguínea se determinó: glucemia, HbA1c, colesterol total, HDL colesterol, LADL colesterol, triglicéridos, insulinemia, IGF1 y creatinina.

En la analítica de orina se midió la albuminuria y creatinuria.

Los datos se anotaron en el **questionario 2** (ver anexos).



## 2.6.2 CUESTIONARIO ESPECÍFICO DE FUNCIÓN VISUAL VF-14

Como uno de los objetivos de este estudio es el de evaluar también la posible mejoría visual percibida de forma subjetiva por el paciente, utilizamos un cuestionario validado (cuestionario específico de función visual VF-14) para medir la función visual en el control pre-inclusión y la última visita de los 12 meses. Este cuestionario mide la capacidad visual percibida por el paciente basada en 14 actividades diarias que pueden verse afectadas en nuestro caso por el EMD. Los pacientes deben describir el grado de dificultad que tienen para realizar cada actividad según una escala del 0 al 4: 0=Incapaz de hacerla, 1=Mucha, 2=Bastante, 3=Poca o 4=Ninguna. Si la actividad descrita no se realiza “por otras razones distintas de la vista” no se tendrá en cuenta la pregunta para la puntuación global del cuestionario. La puntuación total se calcula como promedio de las respuestas multiplicado por 25, obteniendo así una puntuación entre 100 (mejor función visual) y 0 (peor función visual).

En la siguiente tabla se representan los ítems y opciones de respuesta correspondientes al cuestionario VF-14:

ÍNDICE DE FUNCIÓN VISUAL VF-14
A causa de la vista, incluso llevando gafas ¿cuánta dificultad tiene para... 1. Leer letras pequeñas como la guía telefónica, los nombres de los medicamentos o las etiquetas de artículos de comida. 2. Leer un periódico o un libro. 3. Leer letras grandes de un libro o de un periódico o los números de teléfono. 4. Reconocer personas cuando están cerca de usted. 5. Ver escalones, peldaños o el bordillo de la acera. 6. Leer letreros de las calles y tiendas, los números de las casas o los semáforos. 7. Hacer trabajos manuales finos como coser, arreglar un enchufe o clavar un clavo. 8. Hacer crucigramas, rellenar un impreso o hacer una quiniela. 9. Jugar a las cartas, al dominó o al bingo. 10. Participar en actividades como la petanca, buscar setas, cuidar plantas, mirar escaparates. 11. Cocinar. 12. Ver la televisión. 13. Conducir de día. 14. Conducir de noche.
Categorías de respuestas para cada pregunta: 0: Incapaz de hacerla 1: Mucha 2: Bastante 3: Poca 4: Ninguna - No la hago por otras razones distintas de la vista

Tabla 10. Ítems y respuestas del Índice de Función Visual VF-14

## 2.7 ADMINISTRACIÓN DE SOMATULINA AUTOGEL

Para este estudio se solicitó al Ministerio de Sanidad y Consumo a través de la Farmacia de la FOM el tratamiento con Somatulina Autogel con carácter compasivo. El fármaco fue suministrado por la empresa IPSEN PHARMA. La Somatulina viene en viales precargados listos para su uso que contienen una solución sobresaturada de acetato de lanreotida que corresponde a 0,246 mg de lanreotida base

por miligramo de solución, presentándose en 60 mg, 90 mg o 120 mg. En nuestro caso utilizamos la dosis de 90 mg que inyectamos cada 28-30 días.



Figura 20. Imagen de las diferentes presentaciones de Somatulina Autogel® comercializadas por IPSEN PHARMA.

La vía de administración fue subcutánea profunda administrada en la nalga. El procedimiento para realizar la inyección era el siguiente:

- Sacar la Somatulina de la nevera 30 minutos antes de la administración.
- Quitar el protector del émbolo y protector de la aguja.
- Desinfectar el sitio de la inyección con alcohol.
- Aplicar en el cuadrante superior externo de la nalga, perpendicular a la piel, sin plegar ni presionar la piel e insertando la aguja en toda su longitud.
- Inyectar el fármaco empujando el émbolo lentamente sin mover la aguja. Inyectar toda la dosis hasta que el émbolo llegue hasta el final y se oiga un “click”.
- Sin dejar de presionar el émbolo, retirar la aguja del lugar de inyección.
- Dejar de presionar sobre el émbolo de forma que la aguja se retraiga automáticamente.
- Aplicar ligera presión en el lugar de la inyección con una gasa estéril para prevenir un posible sangrado.

El lugar de la inyección debe alternarse entre el lado derecho e izquierdo en cada administración.

## 2.8 CONTROL DE EFECTOS ADVERSOS

Antes del primer control post-basal a los 3 meses se realizaron controles al primer y segundo mes desde el tratamiento sobre posibles efectos adversos locales (dolor, calor, induración y/o eritema) y sistémicos (diarrea, meteorismo, dolor abdominal, náuseas y/o hipoglucemias). Si en este tiempo el paciente refiere efectos adversos sistémicos importantes que dificulten su ritmo de vida habitual se excluirá al paciente del protocolo.

La presencia o ausencia de efectos adversos se registró en el **cuestionario 2** (ver anexos).

## 2.9 RECOGIDA DE DATOS

Los datos de los pacientes fueron recogidos en los cuestionarios preparados para este estudio: Cuestionarios 1A, 1B, 1C, 1D y 2 (ver anexos). Para analizar de manera conjunta a los pacientes y llevar a cabo esta Tesis, se realizó una tabla Excel donde insertamos todos los valores que vamos a estudiar y así facilitar el análisis estadístico.

## 2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 2.10.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Hemos realizado un análisis descriptivo que contiene los estadísticos más relevantes para las variables de análisis: media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana para las variables continuas, así como frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas.

Las variables respuesta se describen en cada uno de los momentos del seguimiento: basal, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses y 1 año. Asimismo, para cada parámetro, se han calculado y descrito las diferencias absolutas 'anual menos basal'.

### 2.10.2 ANÁLISIS INFERENCIAL

A continuación realizamos un análisis inferencial, que engloba el conjunto de tests estadísticos desarrollados para contrastar las hipótesis definidas en los objetivos de la investigación:

- **Test de la t-student:** Se utiliza para contrastar si la media de un parámetro es o no la misma antes y después del tratamiento. Se aplica a variables cuya distribución se ajusta a un patrón normal (test de Kolmogorov), fundamentalmente a las respuestas del ERG.
- **Prueba de Wilcoxon (Wi):** Se utiliza para contrastar la homogeneidad de distribución de la muestra antes y después del tratamiento, por ejemplo si la distribución de las respuestas tomográficas o analíticas ha cambiado tras el año de aplicación de la somatulina. También se empleó para evaluar los posibles cambios en las respuestas al cuestionario de función visual.
- **Prueba de McNemar:** Se usa para comparar el cambio en la distribución de proporciones entre dos mediciones de una variable dicotómica. Ciertas preguntas del cuestionario de salud general se responden dicotómicamente (afirmativo/negativo), por lo que el test de Mc-Nemar valora en esos casos el efecto de la intervención (el tratamiento) en la alteración de dichas respuestas.

El **nivel de significatividad** empleado para todos los análisis ha sido el de 5% ( $\alpha=0.05$ ), de manera que cualquier p-valor menor a 0,05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Por el contrario un p-valor mayor o igual a 0,05 indica ausencia de relación.

## RESULTADOS

# 1 ESTUDIO EXPERIMENTAL

## 1.1 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL VEGF POR LA SOMATULINA

A continuación exponemos los resultados del estudio de inmunohistoquímica para el factor angiogénico VEGF, cuyas imágenes podemos ver en la Figura 21.

Tras realizar el procesado de las muestras se analizaron 4 cortes histológicos de cada grupo, realizándose el recuento de las células positivas para VEGF y calculándose después las medias representativas de cada uno de los grupos.

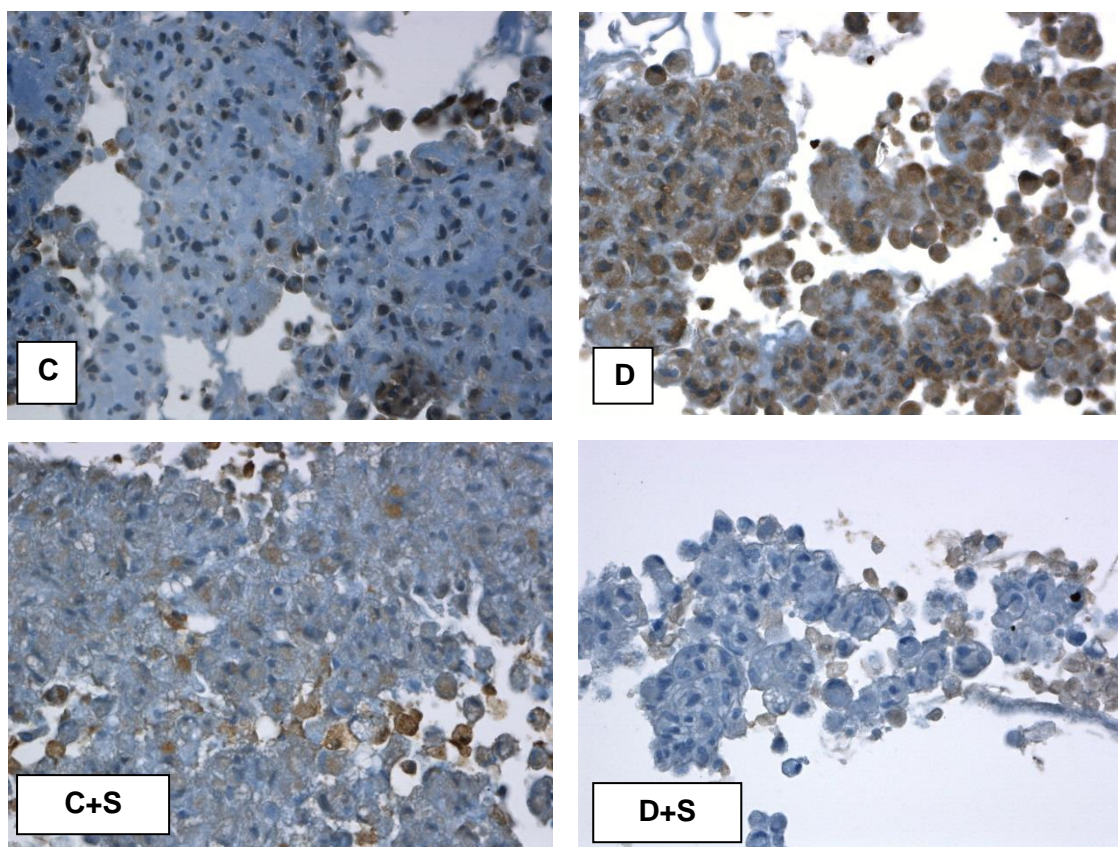


Figura 21. Inmunohistoquímica frente al marcador de angiogénesis VEGF.

Las dos figuras superiores representan los tejidos controles y diabéticos no tratados con somatulina. Las dos figuras inferiores, los tejidos tratados con somatulina. Las células teñidas de color marrón indican positividad para el VEGF.

C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

Los resultados de la expresión del VEGF medidos por inmunohistoquímica se representan en las siguientes tablas (Tabla 11 y 12).

RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DEL VEGF (%)				
GRUPO	C	D	C + S	D + S
MEDIA	79,45	94,14	72,19	80,59
DESVIACIÓN	4,85	6,10	11,79	2,98

Tabla 11 Resultados de la medida de la expresión del VEGF en los diferentes grupos expresadas como porcentaje de células positivas para el VEGF sobre las células totales. Grupo control: 79,45 ± 4,85; Grupo diabéticos: 94,14 ± 6,10; Grupo control tratados con somatulina: 72,19 ± 11,79; Grupo diabéticos tratados con somatulina: 80,59 ± 2,98.

RESULTADOS P VALOR (PRUEBA t-STUDENT)			
C vs D	C vs C+S	D vs D+S	C vs D+S
0,009	0,002	0,007	0,701

Tabla 12. Comparación de medias entre los diferentes grupos entre sí con la t de Student y resultados de p para cada comparación. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

#### 1.1.1 COMPARACIÓN DE MUESTRAS CONTROLES Y DIABÉTICAS NO TRATADOS CON SOMATULINA

La inmunohistoquímica frente a VEGF reveló que las muestras diabéticas contenían significativamente mayor proporción de células positivas al VEGF (94,14 ± 6,10) en comparación con las células controles (79,45 ± 4,85) con una  $p=0,009$ , sugiriendo la implicación de VEGF en la patogenia de la RD.

#### 1.1.2 COMPARACIÓN DE MUESTRAS TRATADAS CON SOMATULINA FRENTE A LAS NO TRATADAS

Por otra parte se observó también que las células tratadas con S, tanto controles (72,19 ± 11,79) como diabéticos (80,59 ± 2,98) contenían menor cantidad de células positivas al VEGF en comparación con los grupos controles (79,45 ± 4,85) y diabéticos no tratados (94,14 ± 6,10) alcanzando todos los resultados la significancia estadística: controles versus controles + somatulina ( $p=0,002$ ), diabéticos versus diabéticos + somatulina ( $p=0,007$ ).

#### 1.1.3 COMPARACIÓN DE MUESTRAS DIABÉTICAS TRATADAS CON SOMATULINA FRENTE A LOS CONTROLES NO TRATADOS

No se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,70$ ) en la expresión del VEGF en células diabéticas tratadas con S (80,59 ± 2,98) en comparación con las muestras controles no tratadas (79,45 ± 4,85), siendo la expresión de VEGF en los diabéticos tratados prácticamente igual que en controles sanos.

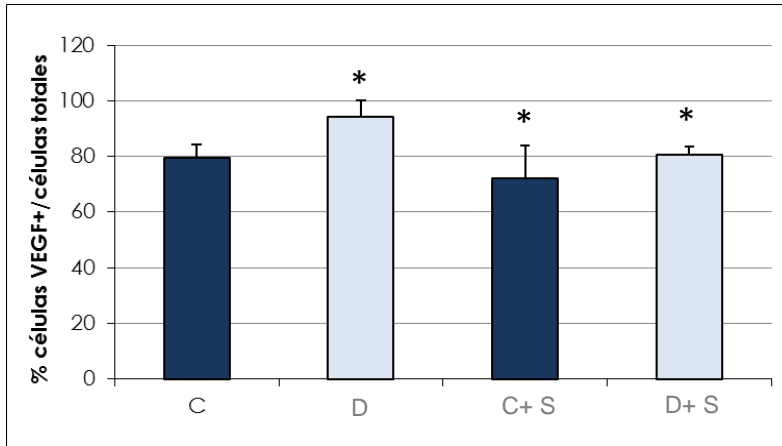


Figura 22. Gráfica donde se representa la expresión del marcador de angiogénesis VEGF en cada uno de los grupos. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina. \* $p < 0,05$ .

## 1.2 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE APOPTOSIS POR LA SOMATULINA

Para estudiar el efecto de la S sobre la apoptosis celular determinamos los niveles de caspasa-3, que es un marcador esencial de los procesos de apoptosis. A continuación se exponen los resultados que obtuvimos.

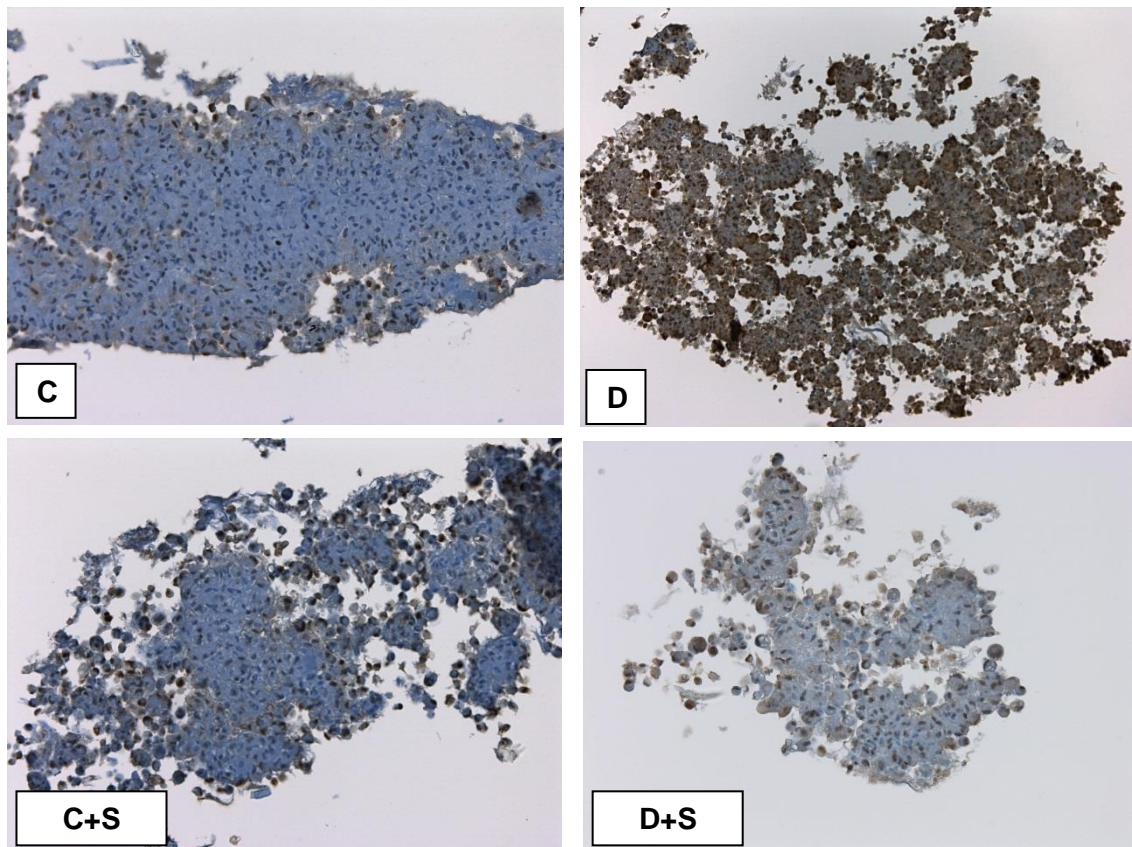


Figura 23. Inmunohistoquímica que muestra la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3.

Las dos figuras superiores representan los tejidos controles y diabéticos no tratados con somatulina. Las dos figuras inferiores, los tejidos tratados con somatulina. Las células teñidas de color marrón indican positividad para la caspasa-3. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina. .



Los resultados de la expresión de caspasa-3 medidos por inmunohistoquímica se representan en las siguientes tablas (Tabla 13 y 14).

	<b>RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE CASPASA-3 (%)</b>			
GRUPO	C	D	C + S	D + S
MEDIA	55,80	77,15	49,99	47,39
DESVIACIÓN	8,99	12,48	8,48	11,91

Tabla 13. Resultados de la medida de la expresión de caspasa-3 en los diferentes grupos expresadas como porcentaje de células positivas para el caspasa-3 sobre las células totales. Grupo control:  $55,80 \pm 8,99$ ; Grupo diabéticos:  $77,15 \pm 12,48$ ; Grupo control tratados con somatulina:  $49,99 \pm 8,48$ ; Grupo diabéticos tratados con somatulina:  $47,39 \pm 11,91$ .

<b>RESULTADOS P VALOR (PRUEBA t-STUDENT)</b>			
C vs D	C vs C+S	D vs D+S	C vs D+S
0,032	0,383	0,013	0,302

Tabla 14. Comparación de medias entre los diferentes grupos entre sí con la t de Student y resultados de p para cada comparación. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

### **1.2.1 COMPARACIÓN DE MUESTRAS CONTROLES Y DIABÉTICAS NO TRATADOS CON SOMATULINA**

Se observó que el grupo de diabéticos presentaba un número significativamente mayor de caspasa-3 ( $77,15 \pm 12,48$ ) en comparación con el grupo control ( $55,80 \pm 8,99$ ) con una  $p=0,032$ .

### **1.2.2 COMPARACIÓN DEL GRUPO DE DIABÉTICOS TRATADOS CON SOMATULINA FRENTE AL GRUPO DE DIABÉTICOS NO TRATADOS**

Además las muestras diabéticas tratadas con somatulina, contenían menor cantidad de caspasa-3 ( $47,39 \pm 11,91$ ) en comparación con las muestras diabéticas no tratadas ( $77,15 \pm 12,48$ ), siendo los resultados significativamente estadísticos con una  $p=0,013$ .

### **1.2.3 COMPARACIÓN DE MUESTRAS DIABÉTICAS TRATADAS CON SOMATULINA FRENTE A LOS CONTROLES NO TRATADOS**

No hallamos diferencias significativas ( $p= 0,302$ ) en la expresión de caspasa-3 entre las células diabéticas tratadas con S y los controles no tratados con unos valores medios de ( $47,39 \pm 11,91$ ) en las muestras diabéticas tratadas y ( $55,80 \pm 8,99$ ) en las muestras controles.

A continuación representamos de forma gráfica los resultados de la expresión de caspasa-3 en los diferentes grupos.



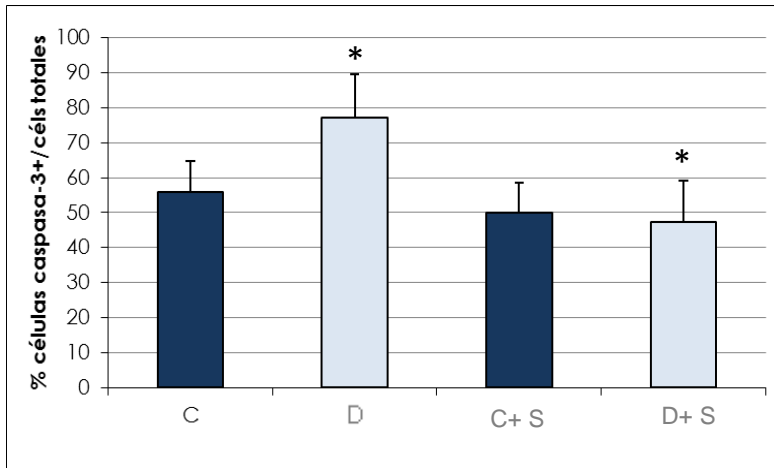


Figura 24. Gráfica donde se representa la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3 en cada uno de los grupos. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina. \* $p < 0,05$ .

### 1.3 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR LA SOMATULINA

Para determinar el papel de la S en la regulación del estrés oxidativo determinamos la expresión del JNK en cada uno de los grupos.

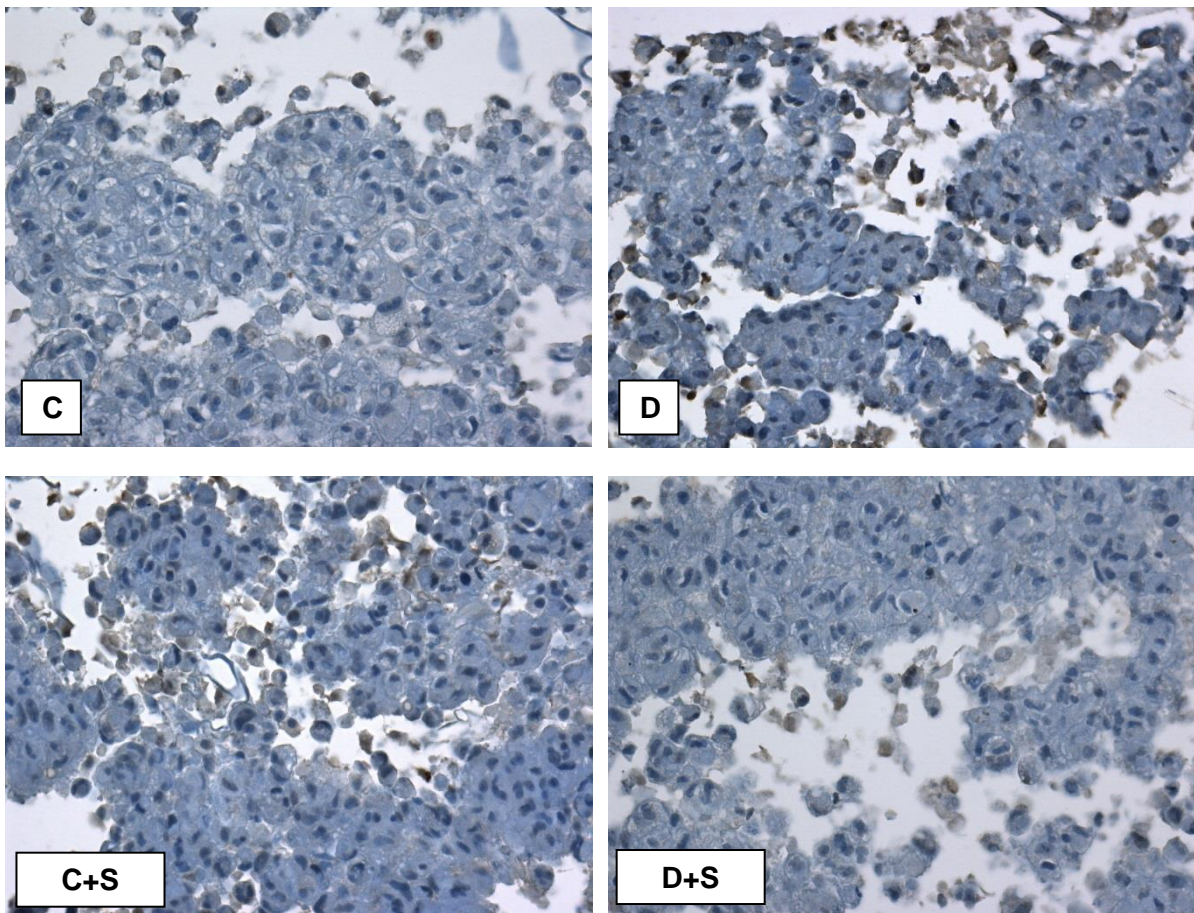


Figura 25. Inmunohistoquímica que muestra la expresión del marcador de estrés oxidativo JNK.

Las dos figuras superiores representan los tejidos controles y diabéticos no tratados con somatulina. Las dos figuras inferiores, los tejidos tratados con somatulina. Las células teñidas de color marrón indican positividad para la JNK. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

Los resultados de la expresión de JNK medidos por inmunohistoquímica se representan en las siguientes tablas (Tabla 15 y 16).

RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE JNK (%)				
GRUPO	C	D	C + S	D + S
MEDIA	41,34	55,49	38,49	35,76
DESVIACIÓN	4,85	4,81	10,68	6,17

Tabla 15. Resultados de la medida de la expresión de JNK en los diferentes grupos expresadas como porcentaje de células positivas para el JNK sobre las células totales. Grupo control:  $41,34 \pm 4,85$ ; Grupo diabéticos:  $55,49 \pm 4,81$ ; Grupo control tratados con somatulina:  $38,49 \pm 10,68$ ; Grupo diabéticos tratados con somatulina:  $35,76 \pm 6,17$ .

RESULTADOS P VALOR (PRUEBA t-STUDENT)			
C vs D	C vs C+S	D vs D+S	C vs D+S
0,0006	0,227	0,002	0,204

Tabla 16. Comparación de medias entre los diferentes grupos entre sí con la t de Student y resultados de p para cada comparación. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

### 1.3.1 COMPARACIÓN DE MUESTRAS CONTROLES Y DIABÉTICAS NO TRATADOS CON SOMATULINA

La expresión de JNK en las muestras diabéticas ( $55,49 \pm 4,81$ ) era significativamente mayor que en las muestras controles ( $41,34 \pm 4,85$ ), siendo  $p=0,0006$ .

### 1.3.2 COMPARACIÓN DE MUESTRAS TRATADAS CON SOMATULINA FRENTE A LAS NO TRATADAS

Por otra parte se observó como la positividad para la JNK en el grupo de diabéticos tratados con S ( $35,76 \pm 6,17$ ) era menor que en los diabéticos que no recibieron el tratamiento ( $55,49 \pm 4,81$ ) y las diferencias fueron significativamente estadísticas ( $p=0,002$ ).

### 1.3.3 COMPARACIÓN DE MUESTRAS DIABÉTICAS TRATADAS CON SOMATULINA FRENTE A LOS CONTROLES NO TRATADOS

No se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,204$ ) en el nivel de JNK en los diabéticas tratados con S ( $35,76 \pm 6,17$ ) en comparación con las controles no tratadas ( $41,34 \pm 4,85$ ).

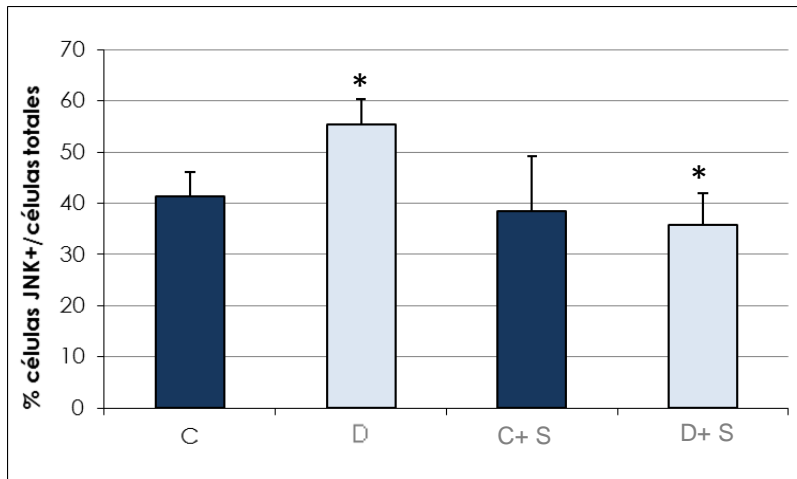


Figura 26. Gráfica donde se representa la expresión del marcador de estrés oxidativo JNK en cada uno de los grupos. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina. \*p<0,05.

#### 1.4 CORRELACIONES

Para establecer la relación existente en la expresión de los diferentes marcadores utilizados, realizamos un análisis de correlación de Spearman (r) entre el VEGF, caspasa-3 y JNK.

Observamos correlaciones positivas estadísticamente significativas entre los tres parámetros. Los datos aparecen representados en la siguiente tabla:

CORRELACIÓN DE PEARSON		
VEGF-CASPASA-3	Pearson	0,558
	Valor p	0,025
VEGF-JNK	Pearson	0,590
	Valor p	0,016
CASPASA-3- JNK	Pearson	0,544
	Valor p	0,029

Tabla 17. Resumen de correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados

Los siguientes gráficos de dispersión representan la relación entre los diferentes marcadores.

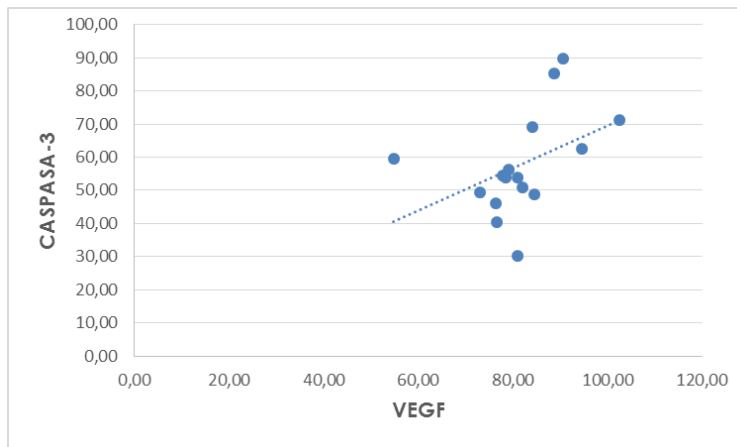


Figura 27. Gráfico de dispersión donde se observa la correlación directa encontrada entre el VEGF y la caspasa-3, con un p valor de 0,025.

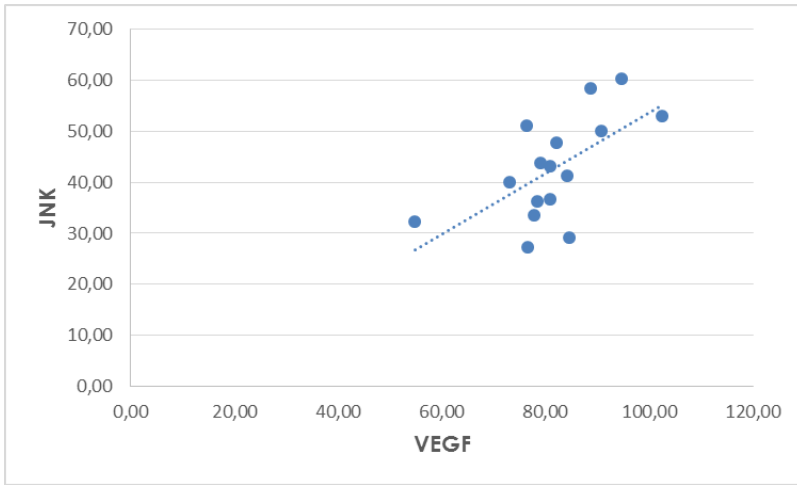


Figura 28. Gráfico de dispersión donde se observa la correlación directa encontrada entre el VEGF y la JNK, con un p valor de 0,016.

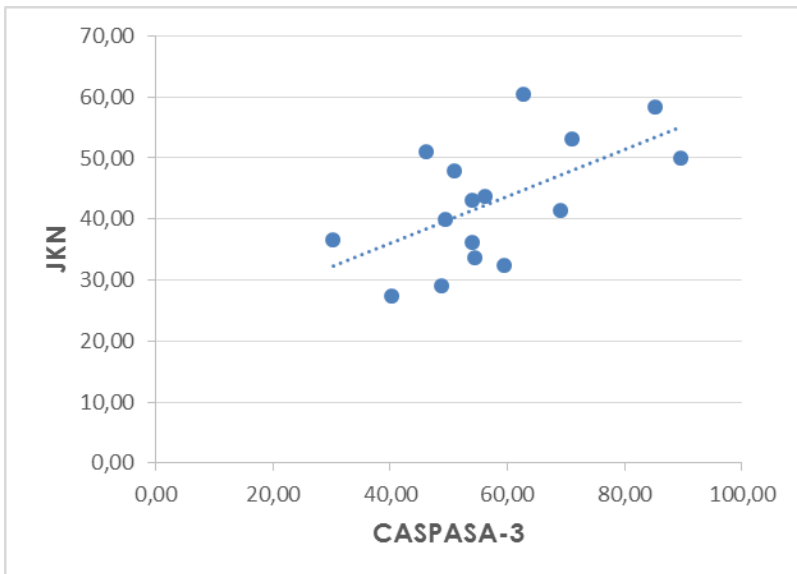


Figura 29. Gráfico de dispersión donde se observa la correlación directa encontrada entre la caspasa-3 y JNK, con un p valor de 0,029.

## 2 ESTUDIO CLÍNICO

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la parte clínica de esta tesis, que consiste en evaluar la eficacia del tratamiento con Somatulina Autogel® para el EMD refractario a las terapias estándares.

Realizamos un estudio prospectivo no aleatorizado, sin grupo control. De los pacientes diabéticos vistos en la FOM entre 2008 y 2009 con EMD refractario, 18 pacientes cumplieron los criterios de inclusión especificados en el apartado de Material y Métodos. Cinco pacientes abandonaron el estudio antes del primer año, especificándose las causas más adelante. A efectos del análisis estadístico utilizamos los datos de los 26 ojos de los 13 pacientes que completaron todo el año de seguimiento. Los pacientes fueron tratados con inyecciones subcutáneas de Somatulina Autogel mensuales. La efectividad del tratamiento se evaluó analizando los cambios en AV, espesor macular en la OCT, ERG y cuestionarios de satisfacción según detallado anteriormente. Además se valoraron los posibles cambios en los parámetros bioquímicos y tensión arterial inducidos por la Somatulina.

### 2.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

#### 2.1.1 MUESTRA, SEXO Y EDAD

La muestra está constituida por 26 ojos de 13 pacientes. Los pacientes presentan una edad media de  $63,2 \pm 10,4$  años, con un rango que oscila entre los 48 y 81 años. Nueve pacientes son varones (69,2%) y cuatro son mujeres (30,8%).

EDAD (años)				
MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
63,2	10,4	48,0	81,0	63,0

Tabla 18. Edad media, desviación típica, mínima, máxima y mediana de la muestra.

SEXO	N	%
TOTAL	13	100%
HOMBRE	9	69,2%
MUJER	4	30,8%

Tabla 19. Distribución de la muestra a estudio según sexos.

### 2.1.2 TIPO DE DIABETES

Todos los sujetos están diagnosticados de diabetes de tipo II, a excepción de un caso con tipo I.

TIPO DE DIABETES	N	%
TOTAL	13	100
TIPO I	1	7,7
TIPO II	12	92,3

Tabla 20. Representación de la muestra según el tipo de diabetes.

### 2.1.3 TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA DIABETES

Los pacientes presentan un tiempo medio de evolución de su diabetes de  $17,8 \pm 10,2$  años, con un rango que oscila entre los 5 y 35 años.

TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA DM (años)				
MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
17,8	10,2	5,0	35,0	17,0

Tabla 21. Tiempo de evolución de la DM medio, desviación típica, mínimo, máximo y mediana de la muestra.

### 2.1.4 TRATAMIENTOS RECIBIDOS PARA LA DIABETES

De los 13 pacientes incluidos: 4 (30,77%) eran tratados con antidiabéticos orales, 6 (46,15%) con antidiabéticos orales más insulina y 3 (23,08%) únicamente con insulina.

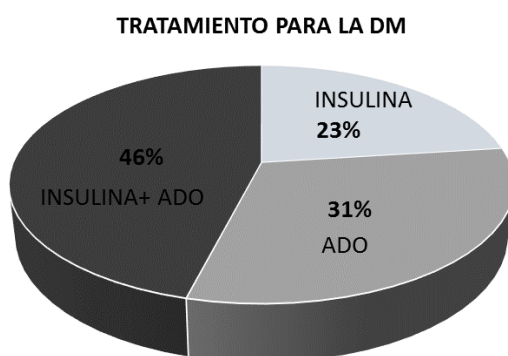


Figura 30. Gráfico que representa el tipo de tratamiento recibido para la DM en la visita basal. ADO: Antidiabéticos orales.

### 2.1.5 PESO, TALLA E ÍNDICE DE MASA CORPORAL

El peso medio de los 13 pacientes incluidos resultó de  $78,7 \pm 13,9$  kg, la talla y el índice de masa corporal de  $1,66 \pm 0,09$  m y  $28,4 \pm 4,4$  kg/m<sup>2</sup> respectivamente, como se resume en las siguientes tablas:

PESO (kg)				
MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
78,7	13,9	57,0	104,0	77,0

Tabla 22. Peso medio, desviación típica, mínimo, máximo y mediana de la muestra.

TALLA (m)				
MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
1,66	0,09	1,49	1,83	1,65

Tabla 23. Talla media, desviación típica, mínima, máxima y mediana de la muestra.

IMC (kg/m <sup>2</sup> )				
MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
28,4	4,4	21,7	37,6	27,2

Tabla 24. Índice de masa corporal (IMC) medio, desviación típica, mínima, máxima y mediana de la muestra.

### 2.1.6 GRADO DE RETINOPATÍA DIABÉTICA

Respecto al grado de RD que presentaban los pacientes en la visita basal, 18 ojos (69,23%) tenían RDNP moderada, 4 ojos (15,38%) RDNP severa y 4 ojos (15,38%) RDP según la clasificación clínica internacional (ver tabla 2).

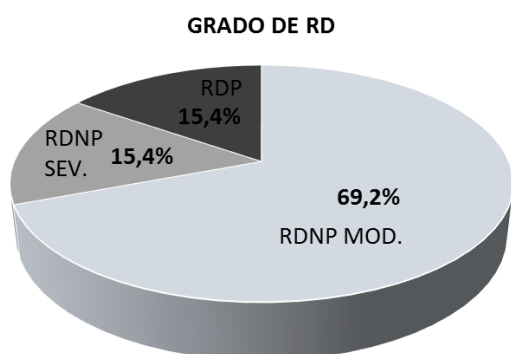


Figura 31. Gráfico que representa el grado de RD en la visita basal. RDNP MOD: Retinopatía diabética no proliferativa moderada; RDNP SEV: Retinopatía diabética no proliferativa severa; RDP: Retinopatía diabética proliferativa.

### 2.1.7 MAGNITUD DEL EDEMA MACULAR

El grosor macular medio inicial del edema macular medido mediante Cirrus-OCT es de 478,12  $\mu\text{m}$  ( $\pm 158,41$ ), con un rango que va desde las 275  $\mu\text{m}$  hasta las 801  $\mu\text{m}$  (Tabla 25). El 7,69 % de los ojos tenía un edema macular menor de 300  $\mu\text{m}$ , el 46,15% entre 301 y 500  $\mu\text{m}$  y el 38,46% igual o mayor a 501  $\mu\text{m}$ .

GROSOR MACULAR ( $\mu\text{m}$ )				
MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
478,12	158,41	275,00	801,00	435,00

Tabla 25. Grosor macular medio, desviación típica, mínima, máxima y mediana de la muestra medida mediante OCT-Cirrus.

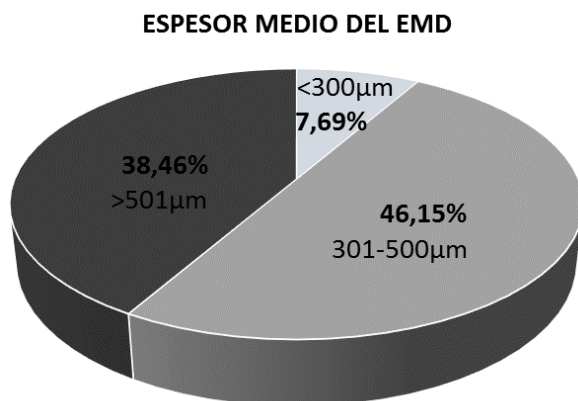


Figura 32. Gráfico que representa la distribución de los espesores medios del edema macular en la visita basal.

### 2.1.8 TRATAMIENTOS PREVIOS

Todos los ojos habían sido tratados previamente con los tratamientos considerados de primera elección: fotocoagulación láser, inyecciones intravítreas de anti-VEGF y de corticoides. Tres ojos habían sido intervenidos también mediante vitrectomía y extracción de membranas en la superficie macular con efecto traccional, siendo el edema macular refractario a todos los tratamientos mencionados.

## 2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 2.2.1 EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO: GANANCIA VISUAL

La efectividad del tratamiento para mejorar la AV se valoró en función del aumento en el número de letras que percibe el paciente. El número de letras medio de cada visita se resumen en la siguiente tabla:

EVOLUCIÓN Nº DE LETRAS LEÍDAS A 4 METROS					
VISITA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
INICIAL	18,00	11,66	0,00	44,00	17,50
1M	21,65	11,62	0,00	45,00	20,00
2M	22,81	11,01	0,00	43,00	22,00
3M	21,58	11,35	0,00	44,00	21,00
6M	24,69	12,56	0,00	51,00	22,50
12M	26,62	12,86	7,00	50,00	25,00

Tabla 26. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el número de letras leídas a 4 metros en la muestra de 26 ojos.

Los resultados muestran una mejoría progresiva de la AV media a lo largo del estudio, pudiéndose observar una mejoría ya al primer mes de iniciar el tratamiento. Al tercer mes se aprecia un leve descenso en AV que posteriormente se recupera y continúa mejorando en los sucesivos controles. La



siguiente figura representa de forma gráfica la evolución en el número de letras leídas durante el año de seguimiento.

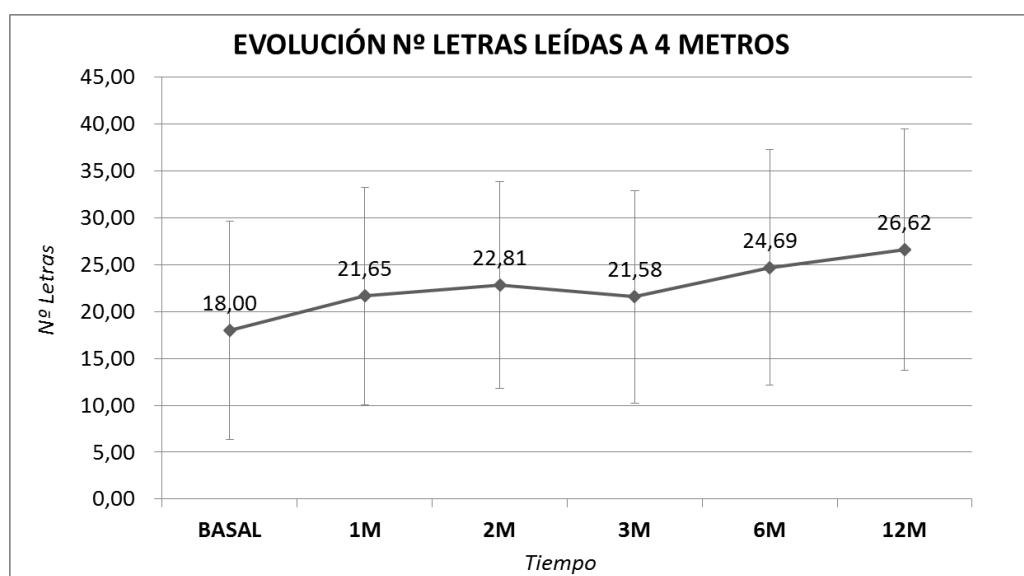


Figura 33. Representación gráfica de la evolución de la AV media en número de letras leídas a 4 metros.

En el momento basal un ojo promedio es capaz de leer 18 letras a 4 metros, incrementándose el número hasta 26,7 letras tras el año de tratamiento. El test de la T Student concluyó que la variación es estadísticamente significativa ( $p=0,002$ ). Por lo que tras el tratamiento existe una **mejoría en AV estadísticamente significativa**.

EVOLUCIÓN Nº DE LETRAS LEÍDAS A 4 METROS			
INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (T TEST)
18,00 ± 11,66	26,62 ± 12,86	8,62 ± 13,07	0,002

Tabla 27. Resumen de los resultados del test T Student para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina representados como media ± desviación estándar.

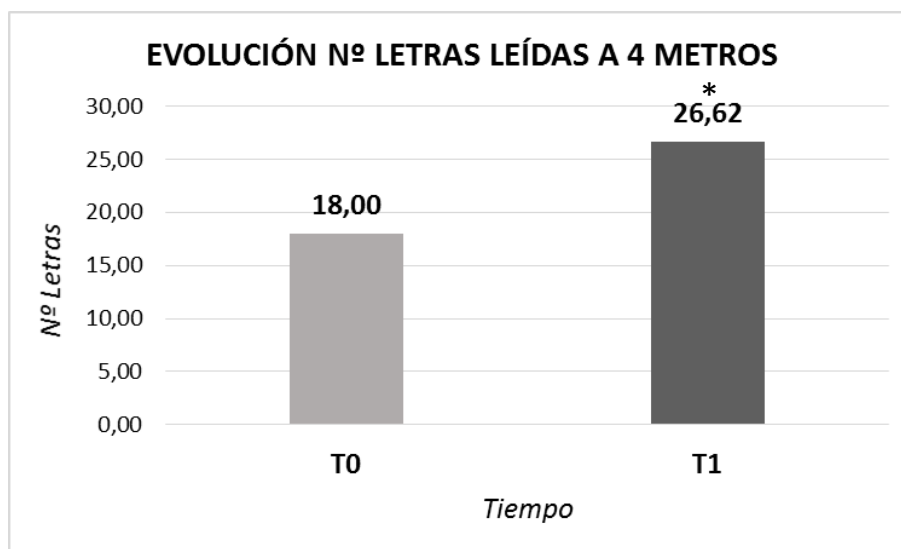


Figura 34. Representación gráfica de la comparativa en el número de letras medio leídas a 4 metros en la primera visita y la última, tras 12 meses de tratamiento. \*p<0,05.

La ganancia media al año de seguimiento en AV fue de 8,62 letras ( $\pm 13,07$ ), con un rango que va desde una pérdida de 21 letras hasta una ganancia de 43 letras. Si dividimos los resultados por intervalos el 50% (13 ojos) gana más de 10 letras y 26,92% (7 ojos) gana más de 15 letras. Por otro lado el 3,85% (1 ojo) pierde más de 15 letras, el 15,38% (4 ojos) pierde 10 letras o menos y el 3,85% (1 ojo) se mantiene igual. Como puede observarse la mayoría de los ojos mejoraron su AV con el tratamiento.



Figura 35. Representación gráfica de la variación en el número de letras leídas a 4 metros entre la primera y última visita por intervalos.

## 2.2.2. EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO: GANANCIA ANATÓMICA

La evaluación de la mejoría anatómica por la Somatulina se valoró mediante el grosor macular central y volumen macular medidos por Cirrus-OCT y el grosor foveal, volumen macular y foveal medidos por Stratus-OCT. A continuación se resumen los resultados de las diferentes visitas con ambas OCTs.

### 2.2.2.1. GROSOR MACULAR CENTRAL (CIRRUS-OCT) Y GROSOR FOVEOLAR (STRATUS-OCT)

EVOLUCIÓN DEL GROSOR MACULAR CENTRAL CIRRUS-OCT ( $\mu\text{m}$ )					
VISITA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
INICIAL	478,12	158,41	275,00	801,00	435,00
3M	425,76	132,84	229,00	745,00	417,00
6M	374,85	145,56	187,00	652,00	336,50
12M	372,15	158,16	200,00	764,00	333,00

Tabla 28. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el grosor macular central medido con Cirrus-OCT en la muestra de 26 ojos.

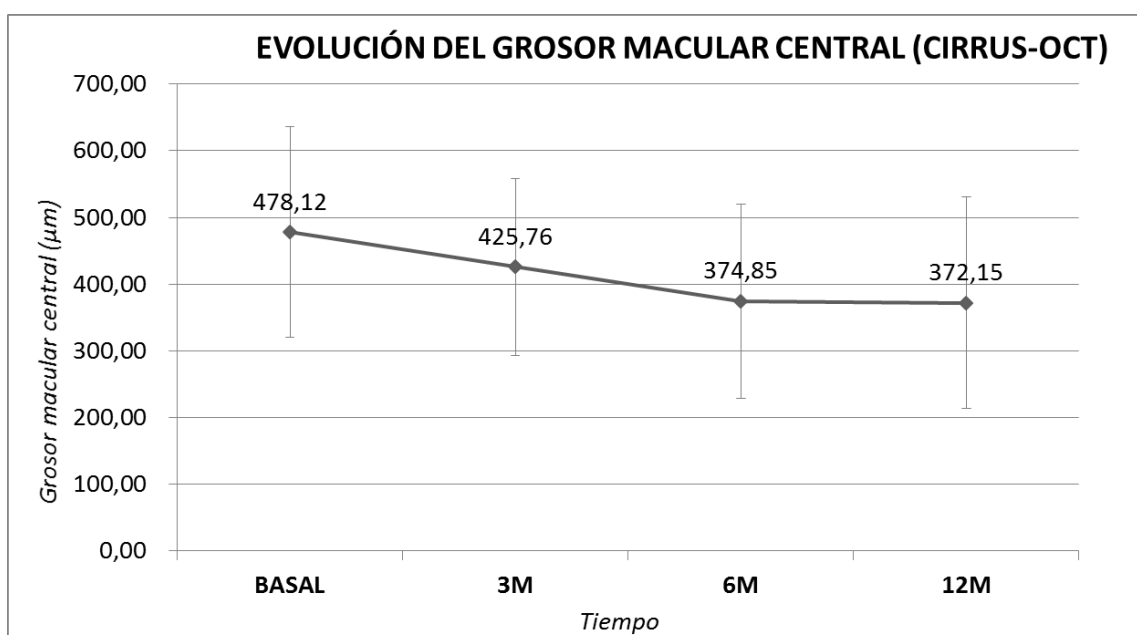


Figura 36. Representación gráfica de la evolución del grosor macular central medio medido mediante Cirrus-OCT.

EVOLUCIÓN DEL GROSOR FOVEAL STRATUS-OCT ( $\mu\text{m}$ )					
VISITA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
INICIAL	437,23	138,61	222,00	713,00	425,00
3M	373,50	125,56	153,00	650,00	365,50
6M	332,31	133,01	149,00	609,00	274,00
12M	344,35	137,90	210,00	722,00	303,50

Tabla 29. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el grosor foveal medido con Stratus-OCT en la muestra de 26 ojos.

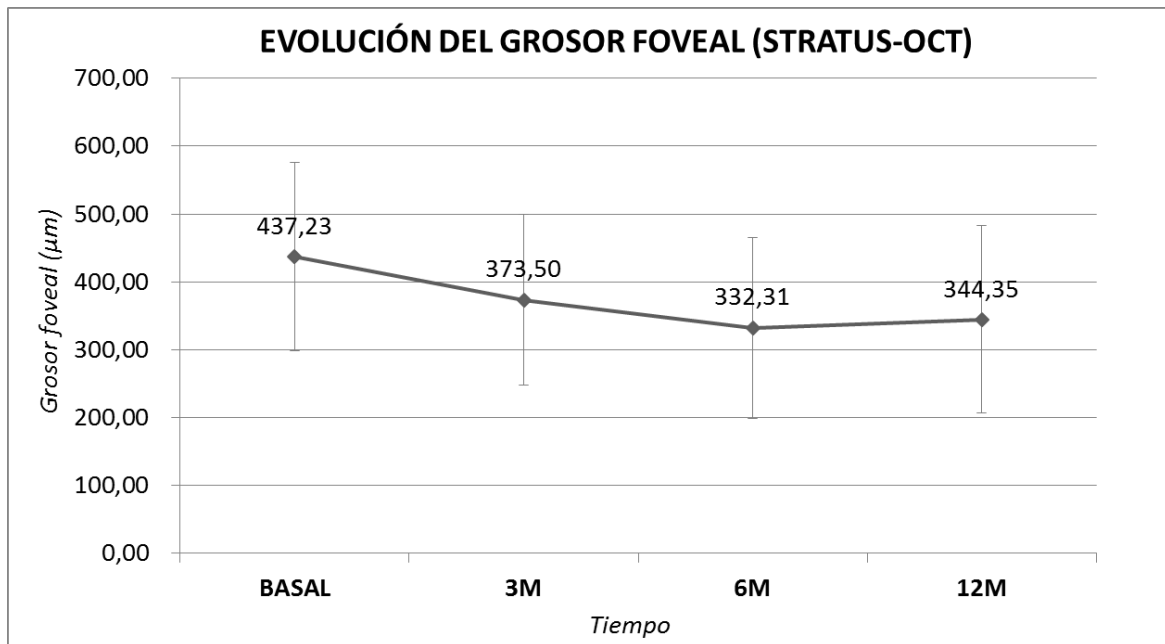


Figura 37. Representación gráfica de la evolución del grosor foveal medio medido mediante Stratus-OCT.

Los resultados muestran una disminución progresiva del espesor macular central tanto con Cirrus como con Stratus, desde el inicio del tratamiento hasta los seis meses. A partir de ahí el espesor macular central se mantiene más o menos estable, sin observarse importantes diferencias respecto a la última visita, a los doce meses de tratamiento.

La disminución media al año de seguimiento en grosor macular central medido con Cirrus-OCT fue de  $-106 \mu\text{m}$  ( $\pm 158,2$ ) y con Stratus-OCT de  $-92,9 \mu\text{m}$  ( $\pm 149,7$ ). Las diferencias en el espesor macular entre los doce meses y la inicial antes de iniciar el tratamiento fueron estadísticamente significativas con la prueba de Wilcoxon ( $p=0,001$ ) para los espesores medidos con ambas OCTs. Por lo tanto tras el tratamiento podemos decir que existe una **mejoría en el espesor macular central estadísticamente significativa**.

EVOLUCIÓN DEL GROSOR MACULAR CENTRAL CIRRUS-OCT ( $\mu\text{m}$ )			
INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (Wi)
478,1 $\pm$ 158,4	372,1 $\pm$ 158,2	-106 $\pm$ 185	0,001

Tabla 30. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del grosor macular central medido por Cirrus-OCT representados como media  $\pm$  desviación estándar.

EVOLUCIÓN DEL GROSOR FOVEAL STRATUS-OCT ( $\mu\text{m}$ )			
INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (Wi)
437,2 $\pm$ 138,6	344,4 $\pm$ 137,9	-92,9 $\pm$ 149,7	0,001

Tabla 31. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del grosor foveal medido por Stratus-OCT representados como media  $\pm$  desviación estándar.

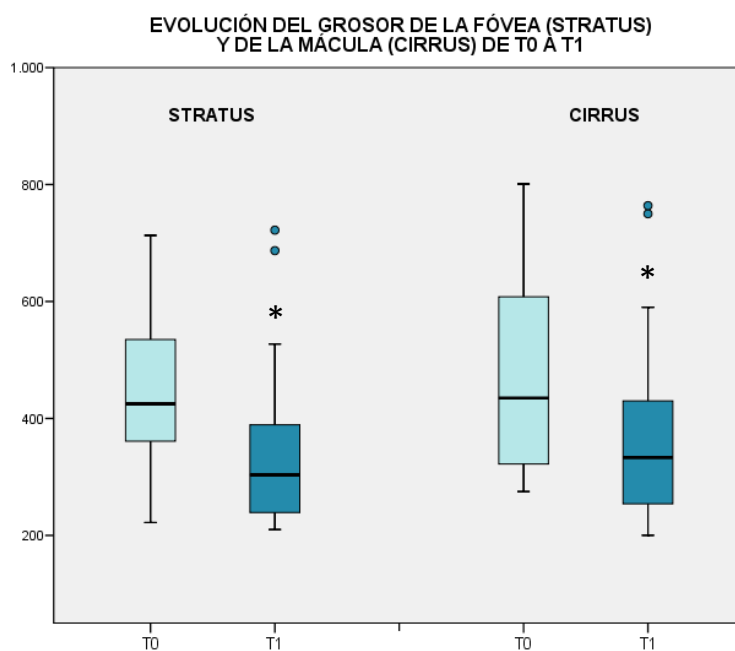


Figura 38. Representación gráfica del cambio en el grosor macular central medio y grosor foveal entre la primer (T0) a y la última visita (T1). \* $p < 0,05$ .

Dividiendo los resultados por intervalos de pérdida de grosor macular central medido con Cirrus-OCT, en un 53,85% (14 ojos) disminuye más de 100 micras y en un 38,46% (10 ojos) disminuye menos de 100 micras. Aunque en la mayoría de ojos disminuyó el espesor macular central, en dos ojos (7,69%) aumentó.

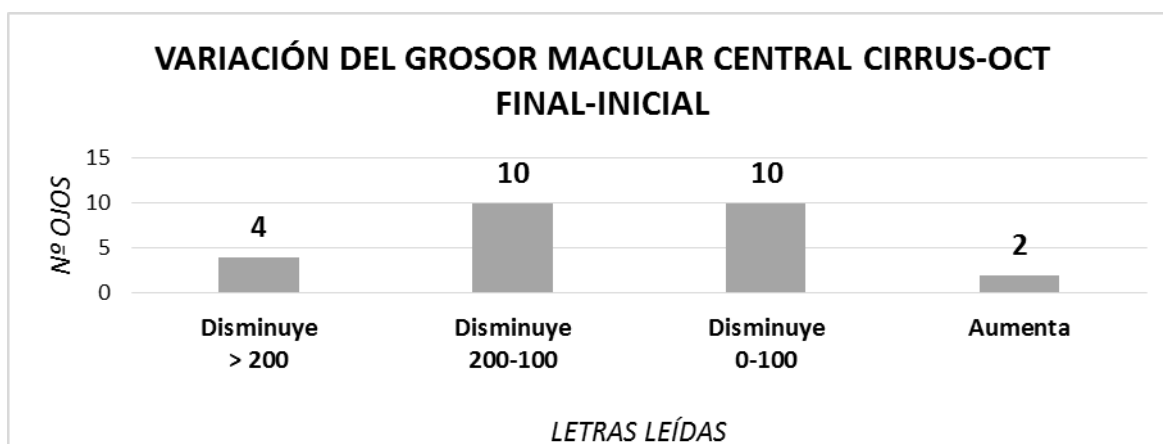


Figura 39. Representación gráfica por intervalos de la variación en el grosor foveal medido por Cirrus-OCT entre la primera y última visita.

Los resultados divididos por intervalos de la pérdida de grosor foveal medido con Stratus-OCT muestran también como en un 53,85% (14 ojos) disminuye más de 100 micras y en un 30,77% (8 ojos) menos de 100 micras. A diferencia del grosor macular central medido con Cirrus-OCT, fueron cuatro ojos (15,38%) en los que aumentó el espesor central a pesar del tratamiento.

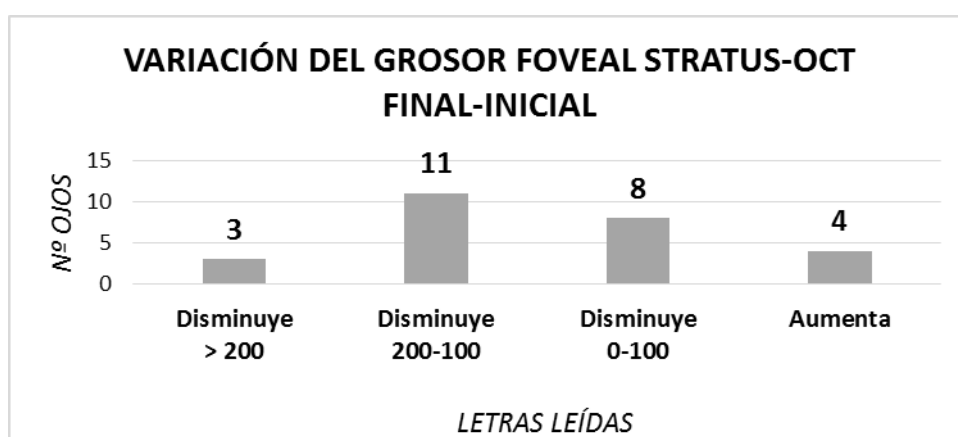


Figura 40. Representación gráfica por intervalos de la variación en el grosor foveal medido por Stratus-OCT entre la primera y última visita.

#### 2.2.2.2. VOLUMEN MACULAR (CIRRUS Y STRATUS-OCT)

EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN MACULAR CIRRUS-OCT (mm <sup>3</sup> )					
VISITA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
INICIAL	13,79	2,76	10,30	21,90	12,80
3M	12,99	2,05	8,90	17,40	13,30
6M	12,45	1,99	8,80	17,40	12,25
12M	12,54	1,87	10,00	15,70	11,95

Tabla 32. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el volumen macular medido con Cirrus-OCT en la muestra de 26 ojos.

EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN MACULAR STRATUS -OCT (mm <sup>3</sup> )					
VISITA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
INICIAL	10,44	2,50	7,24	16,76	9,58
3M	9,36	1,75	5,89	13,09	9,25
6M	9,17	1,82	6,61	14,18	8,92
12M	9,24	1,78	6,68	13,21	8,79

Tabla 33. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el volumen macular medido con Stratus-OCT en la muestra de 26 ojos.

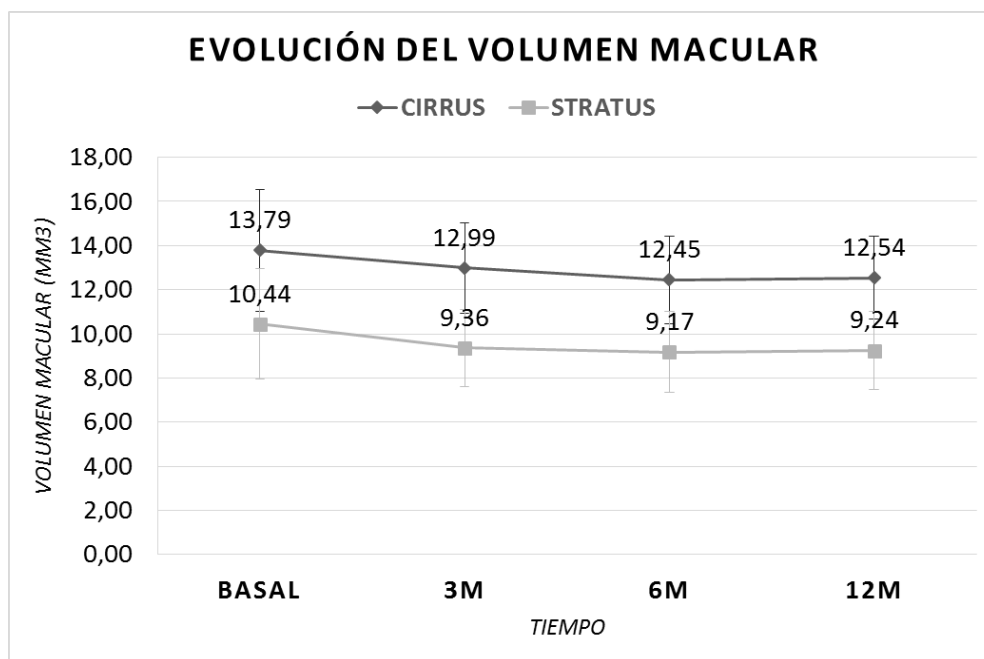


Figura 41. Representación gráfica de la evolución del volumen macular medio medido mediante Cirrus-OCT y Stratus-OCT.

Los resultados muestran una disminución progresiva del volumen macular en ambas OCTs desde el inicio del tratamiento hasta los seis meses, siendo el descenso más acentuado los primeros tres meses del tratamiento. A partir de los seis meses de tratamiento el volumen macular se mantiene bastante estable aunque con un ligero aumento respecto a la visita de los 3 meses.

La disminución media al año de seguimiento del volumen macular medido con Cirrus-OCT fue de  $-1,25 \text{ mm}^3 (\pm 2,10)$  y con Stratus-OCT de  $-1,19 \text{ mm}^3 (\pm 1,73)$ . Las diferencias entre los doce meses y la visita inicial fueron estadísticamente significativas con la prueba de Wilcoxon ( $p=0,001$ ) para los volúmenes medidos con ambas OCTs. Por lo tanto tras el tratamiento podemos decir que existe una **mejoría en el volumen macular estadísticamente significativa.**

EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN MACULAR CIRRUS-OCT ( mm <sup>3</sup> )			
INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (Wi)
13,8 ± 2,76	12,54 ± 1,87	-1,25 ± 2,10	0,001

Tabla 34. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del volumen macular medido con Cirrus-OCT representados como media ± desviación estándar.

EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN MACULAR STRATUS-OCT ( mm <sup>3</sup> )			
INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (Wi)
10,44 ± 2,5	9,24 ± 1,78	-1,19 ± 1,73	0,001

Tabla 35. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del volumen macular medido con Stratus-OCT representados como media ± desviación estándar.

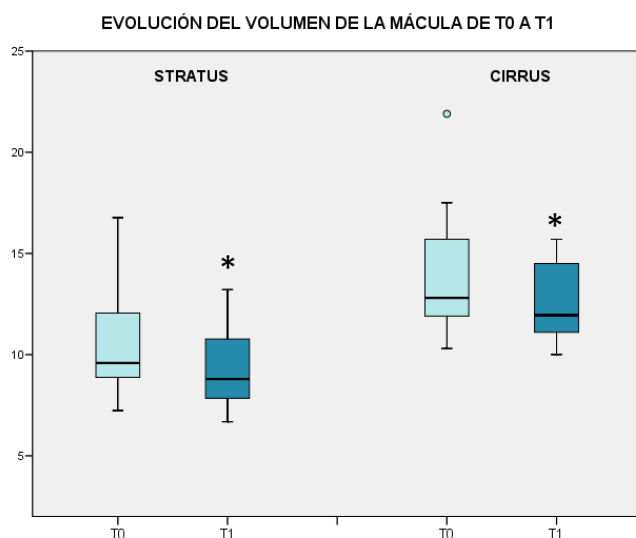


Figura 42. Representación gráfica del cambio en el volumen macular medio entre la primera (T0) y la última visita (T1). \*p<0,05.

### 2.2.2.3. VOLUMEN FOVEAL (STRATUS-OCT)

EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN FOVEAL STRATUS-OCT (mm <sup>3</sup> )					
VISITA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
INICIAL	0,34	0,11	0,17	0,56	0,33
3M	0,29	0,10	0,12	0,51	0,29
6M	0,26	0,10	0,12	0,48	0,22
12M	0,27	0,11	0,16	0,57	0,24

Tabla 36. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el volumen foveal medido con Stratus-OCT en la muestra de 26 ojos.



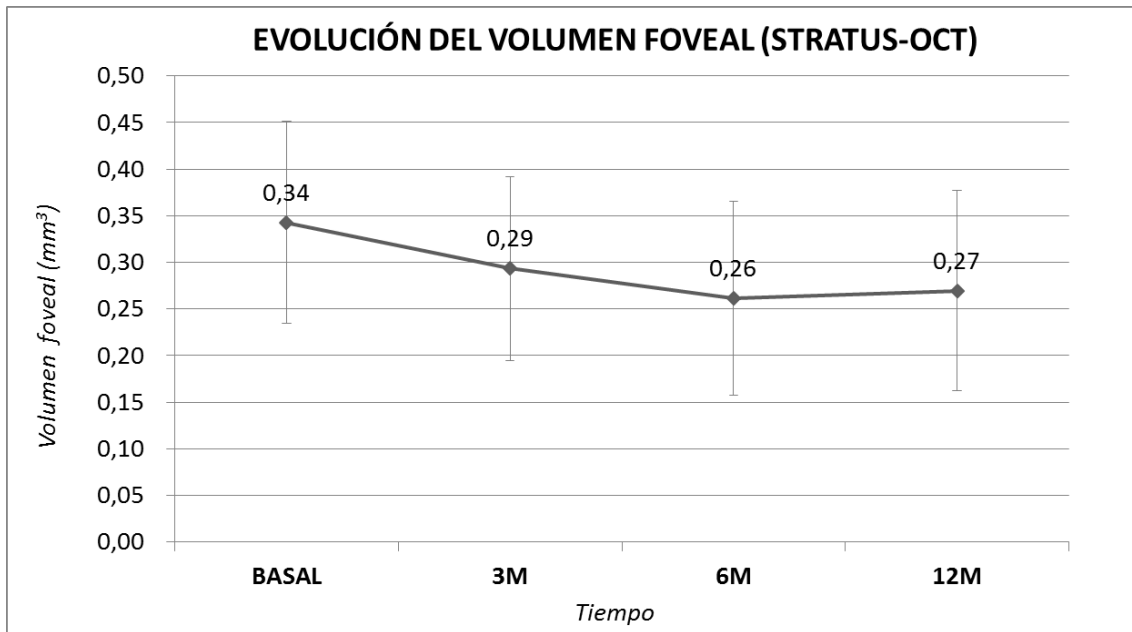


Figura 43. Representación gráfica de la evolución del volumen foveal medio medido mediante Stratus-OCT.

Durante el periodo de tratamiento se observa también una disminución progresiva del volumen foveal desde el inicio del tratamiento hasta los seis meses, siendo el descenso más acentuado los primeros tres meses del tratamiento. A partir de los seis meses de tratamiento los valores medios del volumen foveal se mantienen bastante estables con un leve aumento respecto a la visita de los 3 meses.

La disminución media al año de seguimiento del volumen foveal medido con Stratus-OCT fue de  $-0,07 \text{ mm}^3 (\pm 0,12)$ , siendo las diferencias entre los doce meses y la visita inicial estadísticamente significativas con la prueba de Wilcoxon ( $p=0,002$ ). Por lo tanto tras el tratamiento podemos decir que existe una **mejoría en el volumen foveal estadísticamente significativa**.

EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN FOVEAL STRATUS-OCT ( $\text{mm}^3$ )			
INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (Wi)
0,34 $\pm$ 0,11	0,27 $\pm$ 0,11	-0,07 $\pm$ 0,12	0,002

Tabla 37. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del volumen foveal medido con Stratus-OCT representados como media  $\pm$  desviación estándar.

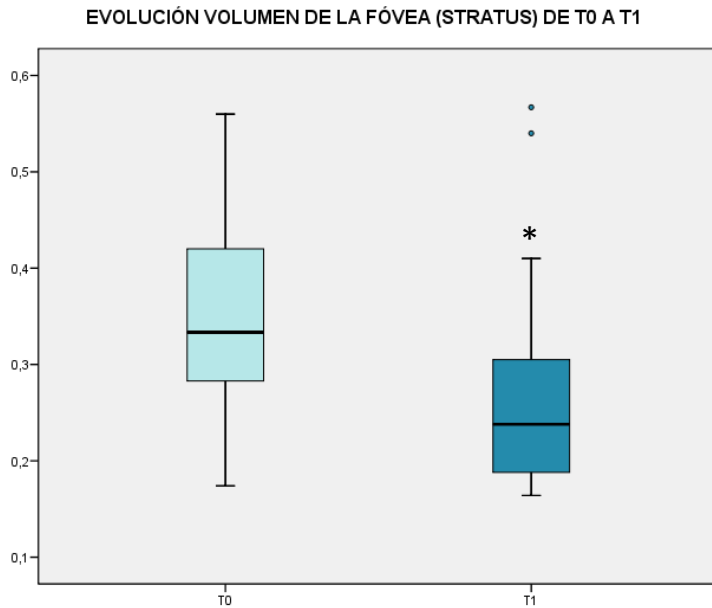


Figura 44. Representación gráfica del cambio en el volumen foveal medio entre la primera (T0) y la última visita (T1). \*p<0,05.

### 2.2.3. EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO: CAMBIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el ERG Pattern y Multifocal.

#### 2.2.3.1. ELECTRORETINOGRAMA PATTERN

##### 2.2.3.1.1. LATENCIA DE RESPUESTA

La evolución de la latencia de respuesta obtenida mediante ERG-Pattern antes del tratamiento y a los 12 meses se resume en la siguiente tabla y gráfico.

<b>EVOLUCIÓN DE LA LATENCIA DE RESPUESTA (ms)</b>			
INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (T TEST)
54,60 ± 5,36	53,15 ± 5,93	-1,16 ± 8,24	0,489

Tabla 38. Resumen de los resultados la prueba de T Student para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina de la latencia de respuesta, representados como media ± desviación estándar.

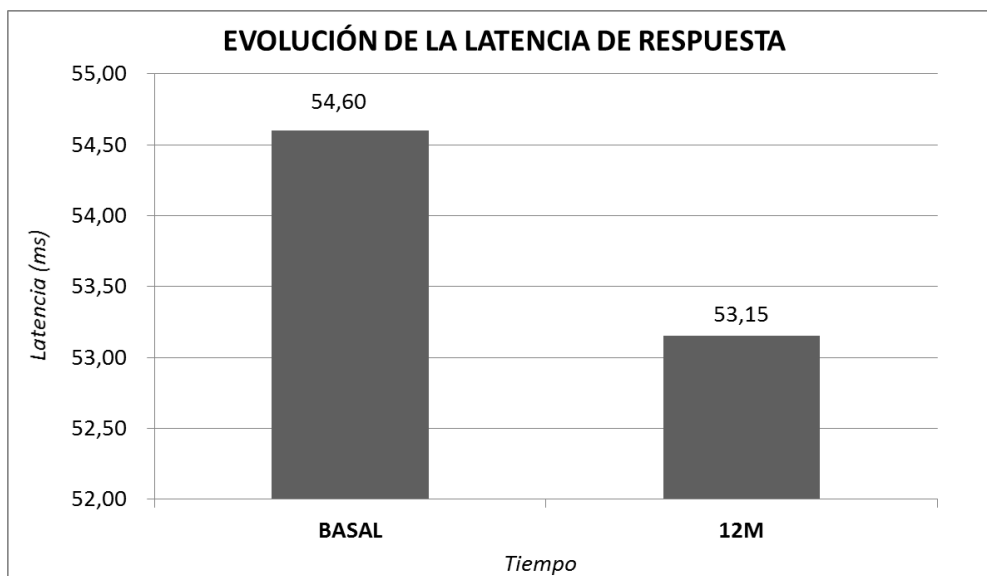


Figura 45. Representación gráfica de la comparativa de la latencia de respuesta media entre la visita basal y después de 12 meses de tratamiento con Somatulina.

#### 2.2.3.1.2. AMPLITUD DE RESPUESTA

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos en amplitud de respuesta en el ERG-Pattern durante el estudio.

EVOLUCIÓN DE LA AMPLITUD DE RESPUESTA ( $\mu\text{V}$ )			
INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (T TEST)
1,68 $\pm$ 1,05	1,85 $\pm$ 1,37	0,20 $\pm$ 1,00	0,317

Tabla 39. Resumen de los resultados la prueba de T Student para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina de la amplitud de respuesta, representados como media  $\pm$  desviación estándar.

A continuación se representan también los resultados de forma gráfica.

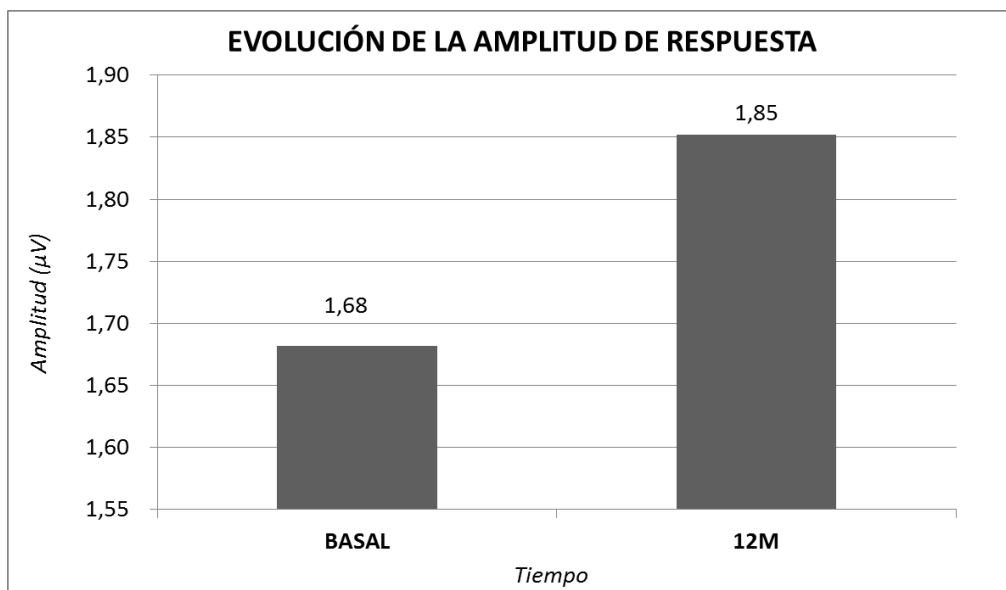


Figura 46. Representación gráfica de la comparativa de la amplitud de respuesta media entre la visita basal y después de 12 meses de tratamiento con Somatulina.

Como puede observarse existe una leve disminución de la latencia y aumento de la amplitud de respuesta pero sin ser estadísticamente significativos los cambios. Por lo tanto puede decirse que **no han cambios estadísticamente significativos en la latencia y amplitud de respuesta** medidos mediante el ERG-Pattern después de 12 meses de tratamiento con Somatulina.

### 2.2.3.2. ELECTORRETINOGRAMA MULTIFOCAL

Las amplitudes medias para cada uno de los seis anillos antes y después del tratamiento se presentan a continuación:

EVOLUCIÓN AMPLITUD DE RESPUESTA ( nV/grados <sup>2</sup> )				
ANILLO	INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (T TEST)
1	25,1 ± 12,9	22,9 ± 11,8	-2,14 ± 13,6	0,431
2	10,3 ± 5,0	12,5 ± 5,3	2,21 ± 6,71	0,106
3	7,3 ± 3,4	8,9 ± 3,8	1,58 ± 4,78	0,103
4	6,0 ± 2,28	6,5 ± 2,02	0,51 ± 2,37	0,286
5	5,02 ± 2,03	4,75 ± 1,63	-0,26 ± 1,53	0,393
6	3,85 ± 1,51	3,69 ± 1,07	-0,16 ± 1,05	0,438

Tabla 40. Resumen de los resultados la prueba de T Student para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina de la amplitud media para cada uno de los anillos concéntricos del ERG multifocal representados como media ± desviación estándar.

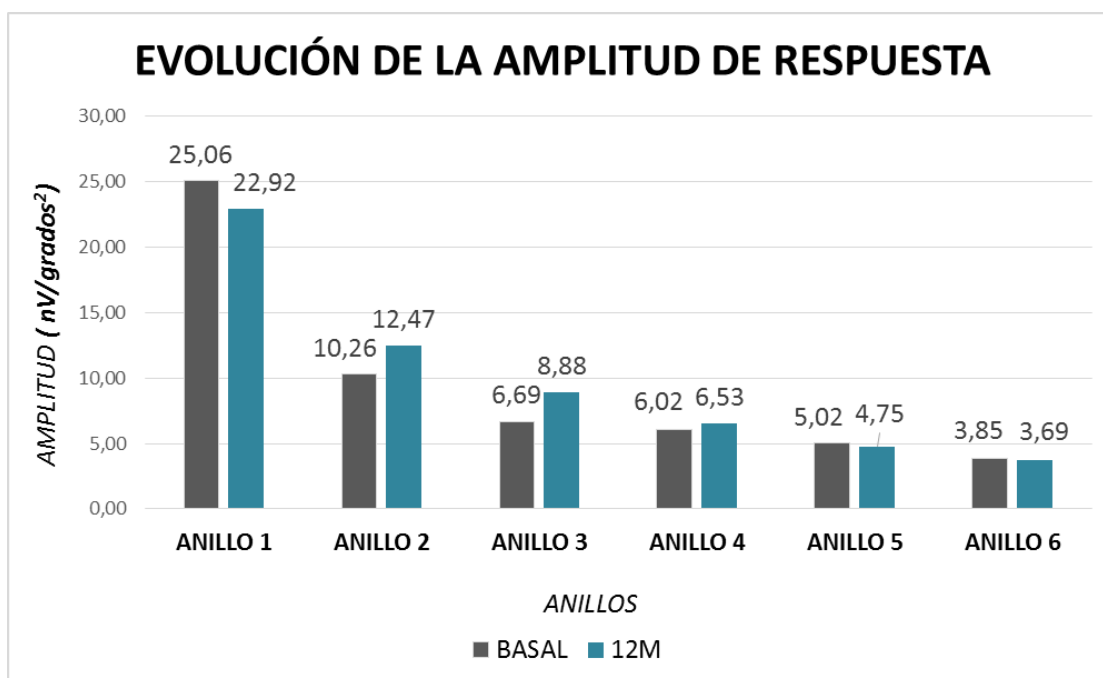


Figura 47. Representación gráfica de la comparativa de la amplitud media de cada uno de los anillos concéntricos del ERG multifocal entre la visita basal y después de 12 meses de tratamiento con Somatulina.

Para ninguna de las medidas se han encontrado diferencias estadísticamente significativas antes y después del tratamiento con Somatulina. Tan sólo los aumentos en el valor de los **anillos 2 y 3** que tienen unos p-valores en torno a 0,1 sugieren una **débil tendencia a aumentar con el tratamiento**.

#### 2.2.4. EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO: CAMBIOS EN TENSIÓN ARTERIAL O PARÁMETROS ANALÍTICOS

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos para la presión arterial, así como los diferentes parámetros analíticos:

EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y TENSIÓN ARTERIAL					
		INICIAL (T0)	FINAL (T1)	DIFERENCIA (T1-T0)	P VALOR (Wi)
PRESIÓN ARTERIAL	SISTÓLICA (mmHg)	157,6 ± 19,6	149,8 ± 16,7	-7,9 ± 13,2	0,123
	DIASTÓLICA (mmHg)	84,9 ± 12,2	78,0 ± 10,74	-6,9 ± 8,5	0,068
ANALÍTICA SANGUÍNEA	GLUCEMIA BASAL (mg/dl)	169,5 ± 51,8	200 ± 96,7	27,92 ± 131	0,556
	HEMOGLOBINA GLICOSILADA (%)	7,41 ± 1,17	8,30 ± 1,15	0,61 ± 1,59	0,075
	COLESTEROL TOTAL (mg/dl)	192,7 ± 45,7	163,7 ± 31	-31,5 ± 42,6	0,019
	COLESTEROL HDL (mg/dl)	43 ± 10,1	46,7 ± 10,5	3,7 ± 7,8	0,192
	COLESTEROL LDL (mg/dl)	111,9 ± 47,9	92,6 ± 29,8	-19,3 ± 44,8	0,398
	TRIGLICÉRIDOS (mg/dl)	165,7 ± 62,7	110,7 ± 44,6	-58,3 ± 60,0	0,010
ANALÍTICA ORINA	CREATININA (mg/dl)	0,85 ± 0,24	0,91 ± 0,24	0,08 ± 0,33	0,433
	PROTEINURIA (g/l)	0,25 ± 0,23	0,04 ± 0,03	-0,21 ± 0,24	0,021
	MICROALBUMINURIA/CREATINURIA (g/mol)	2,48 ± 2,44	183,2 ± 312,9	180,7 ± 313,2	0,593

Tabla 41. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) en la presión arterial y parámetros analíticos representados como media ± desviación estándar.

De todos los parámetros analizados sólo se han detectado variaciones estadísticamente significativas para el colesterol total, triglicéridos y proteinuria. Por lo tanto tras el tratamiento podemos decir que existe un **descenso en el colesterol total, triglicéridos y proteinuria estadísticamente significativos**. Por otro lado aunque sin alcanzar la significatividad estadística, puede observarse una **tendencia al incremento en la hemoglobina glucosilada**, mientras que la **tensión arterial diastólica** muestra una tendencia a la **disminución**.

Por el contrario, **no se han observado cambios significativos ni tendencias en la presión arterial sistólica, glucemia basal, colesterol-HDL, colesterol-LDL, creatinina o microalbuminuria/creatinuria**.

Los siguientes gráficos permiten visualizar los resultados obtenidos para los parámetros que fueron estadísticamente significativos:

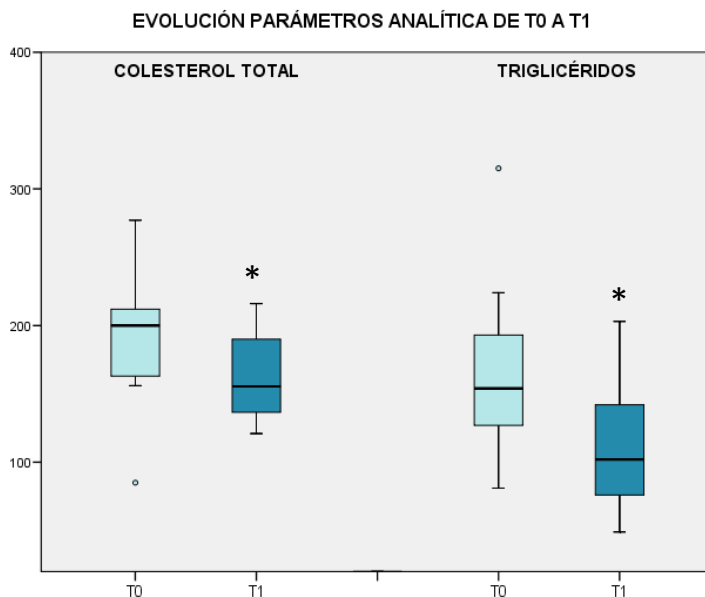


Figura 48. Representación gráfica de los cambios en el colesterol total y triglicéridos medios entre la primera (T0) y la última visita (T1). \* $p < 0,05$ .

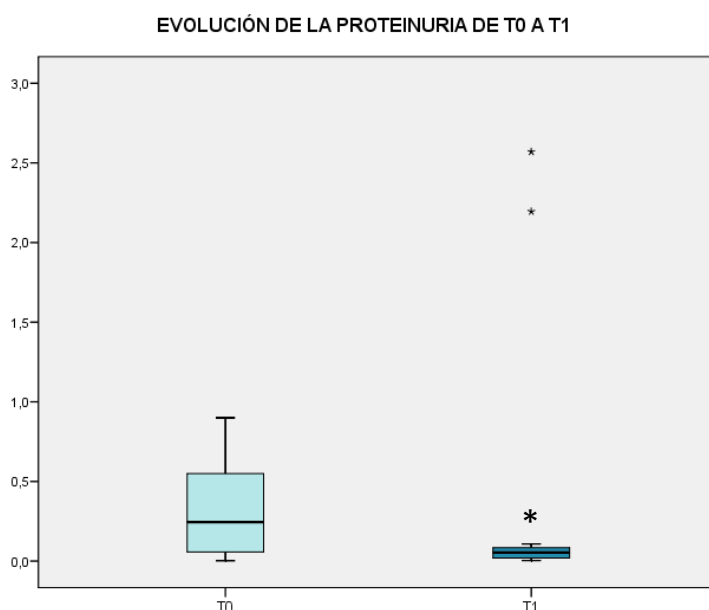


Figura 49. Representación gráfica de los cambios en la proteinuria media entre la primera (T0) y la última visita (T1). \* $p < 0,05$

### 2.2.5. EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO: CUESTIONARIO ESPECÍFICO DE FUNCIÓN VISUAL VF-14

En este apartado se estudian los posibles cambios habidos en las respuestas al cuestionario de función visual VF-14 tras el periodo de administración de Somatulina, para determinar si subjetivamente existen cambios.

La siguiente tabla y gráfico resumen las puntuaciones globales sobre 100 (siendo 100 la mejor función visual y 0 la peor) en el cuestionario de función visual VF-14 para cada uno de los pacientes en las visitas basal y final.

PUNTAJACIÓN GLOBAL DEL CUESTIONARIO ESPECÍFICO DE FUNCIÓN VISUAL VF-14		
PACIENTE	INICIAL (T0)	FINAL (T1)
1	21,43	33,93
2	16,07	16,07
3	37,5	39,29
4	68,75	66,67
5	32,14	28,85
6	38,46	42,31
7	67,86	78,57
8	16,07	10,71
9	69,64	57,69
10	36,36	48,21
11	39,29	50,0
12	62,50	56,25
13	19,23	50,0
MEDIA ± DS	40,41 ± 20,39	44,50 ± 19,09
P VALOR (Wi)	0,308	

Tabla 42. Resumen de las puntuaciones globales para cada paciente en las visitas inicial (T0) y final (T1) y resultado de la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre y post-tratamiento en el test específico de función visual VF-14.

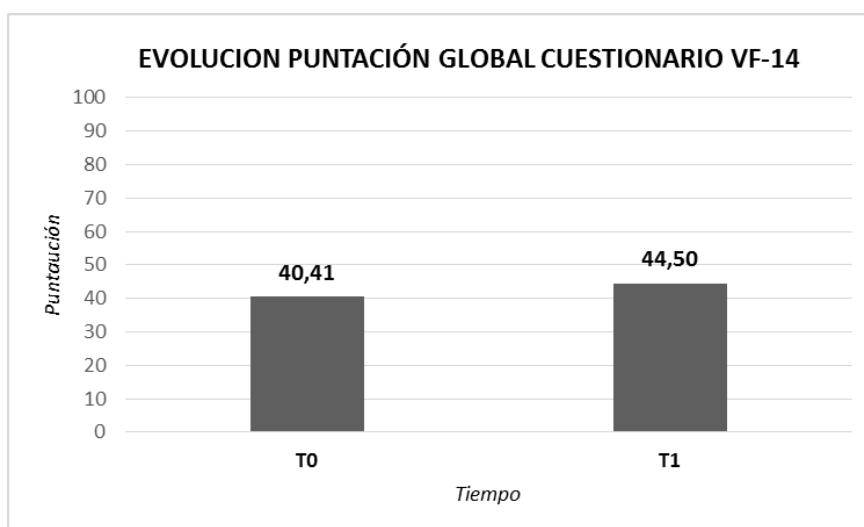


Figura 50. Representación gráfica de los cambios en la puntuación global del cuestionario específico de función visual VF-14 entre la primera (T0) y última visita (T1).

Como puede observarse en la tabla 42, de los 13 pacientes 7 mejoraron su puntuación, 1 permaneció igual y en los 5 restantes disminuyó. La puntuación global media al inicio del estudio fue de  $41,41 \pm 20,39$ , mejorando levemente al final del año de tratamiento a  $44,50 \pm 19,09$ , sin resultar la diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,308$ ). **No hemos observado por lo tanto diferencias estadísticamente significativas en la puntuación global del cuestionario específico de función visual VF-14 antes y después del tratamiento.**

A continuación se presentan de forma gráfica las respuestas para cada una de las preguntas del cuestionario específico de función visual (VF-14) en la visita basal y visita de los doce meses de tratamiento.

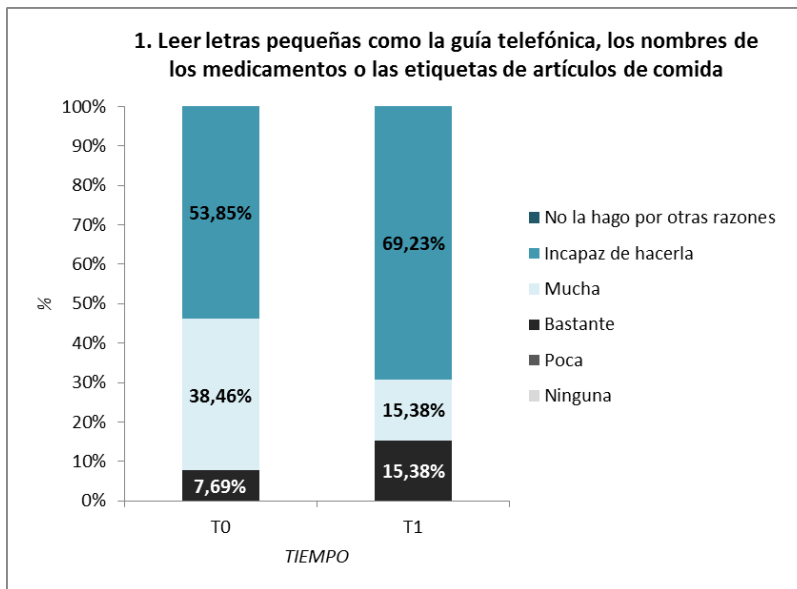


Figura 51. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 1 del cuestionario específico de función visual VF-14.

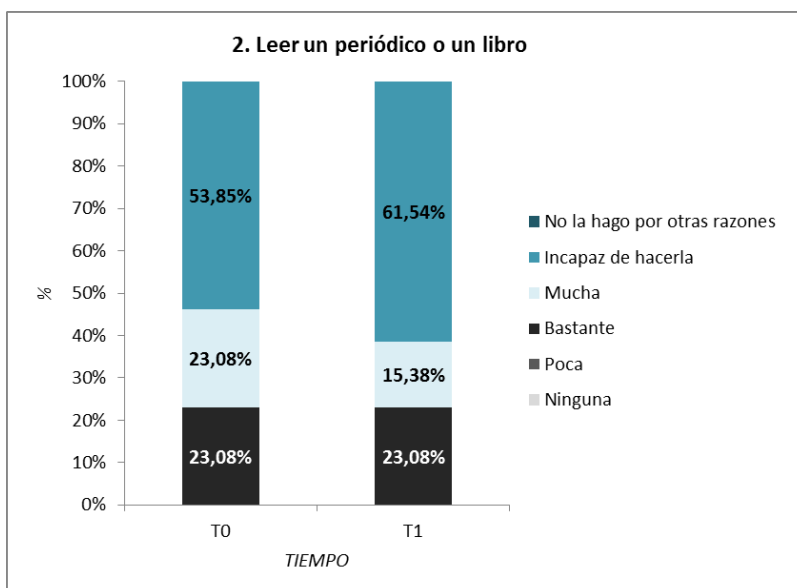


Figura 52. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 2 del cuestionario específico de función visual VF-14.



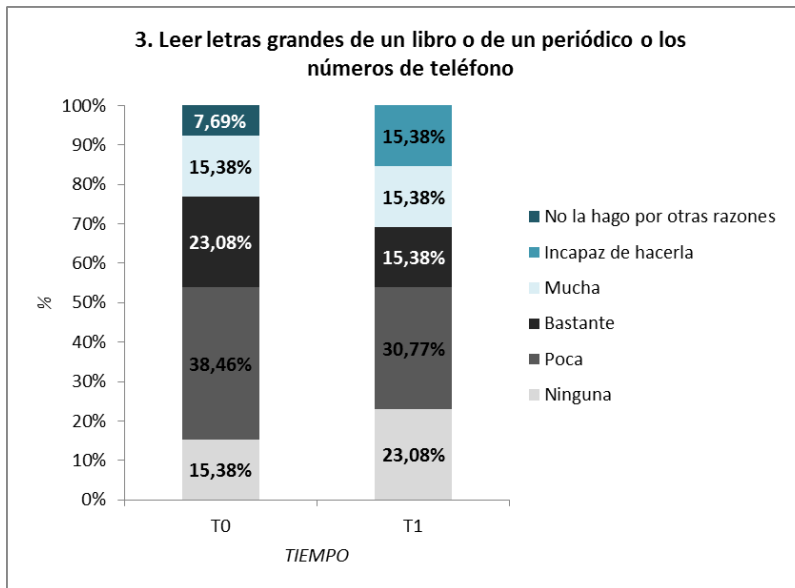


Figura 53. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 3 del cuestionario específico de función visual VF-14.

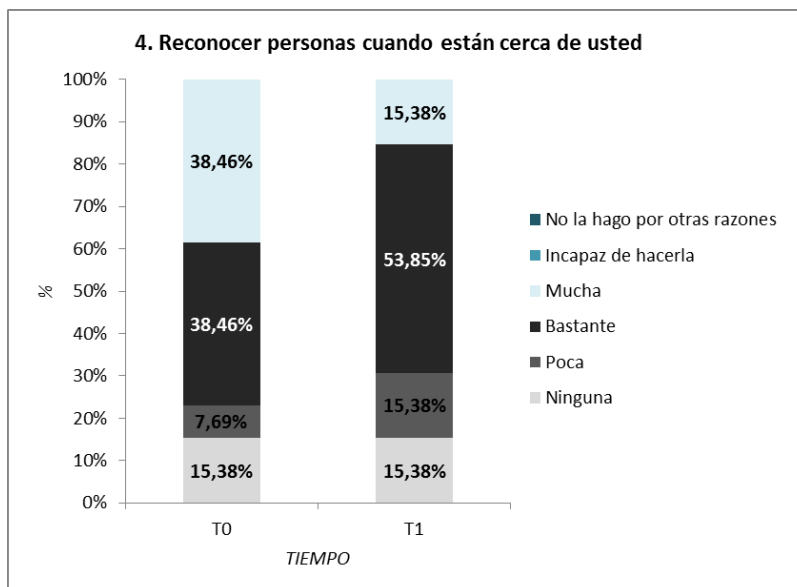


Figura 54. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 4 del cuestionario específico de función visual VF-14.

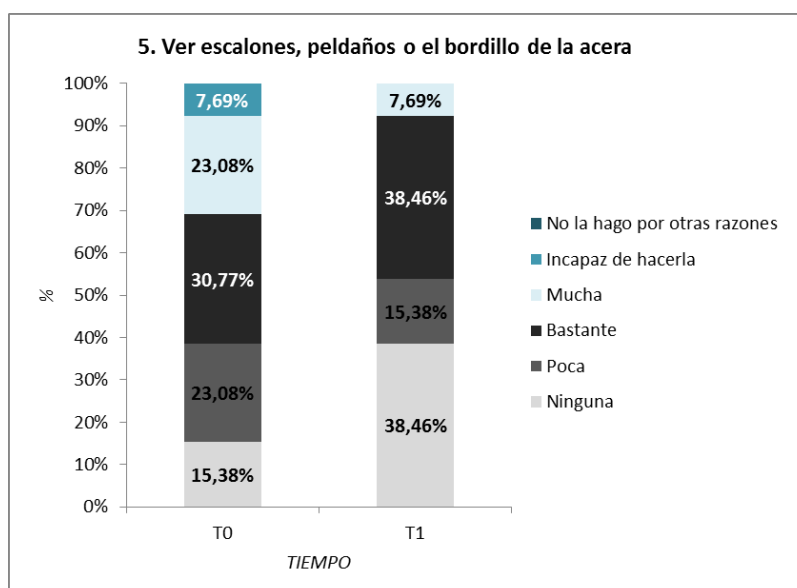


Figura 55. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 5 del cuestionario específico de función visual VF-14.

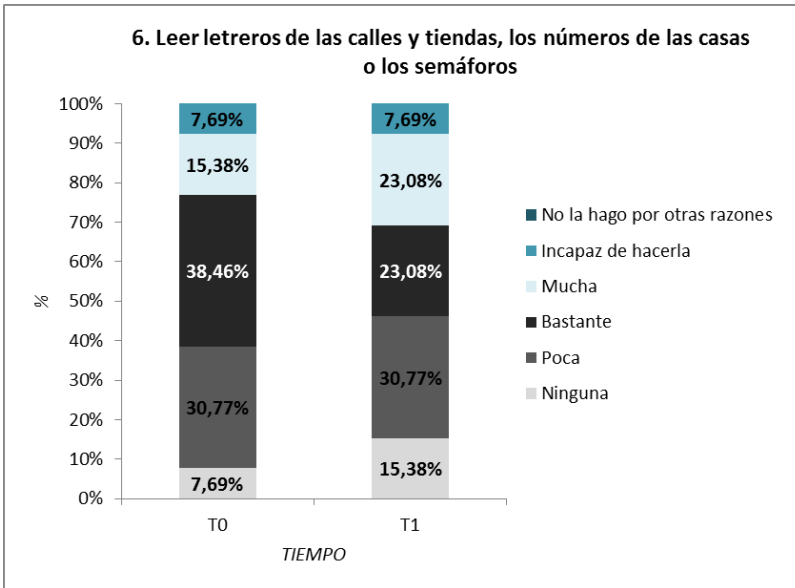


Figura 56. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 6 del cuestionario específico de función visual VF-14.

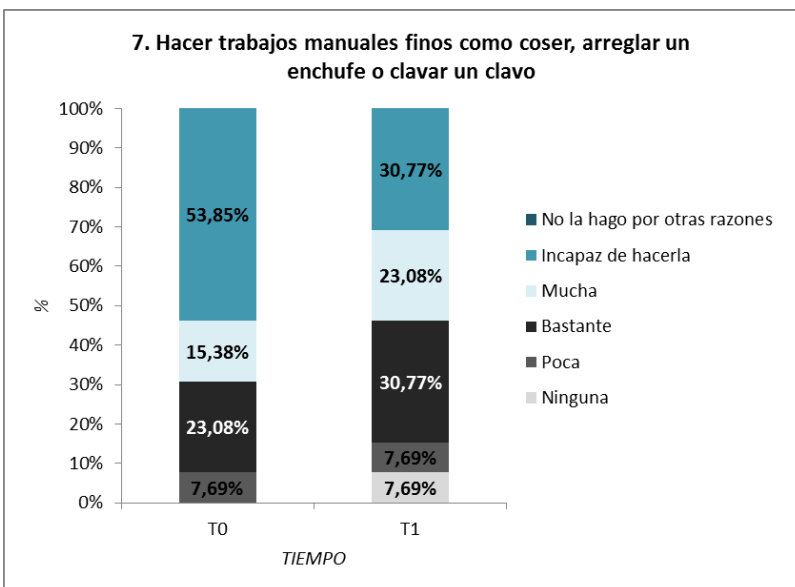


Figura 57. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 7 del cuestionario específico de función visual VF-14.

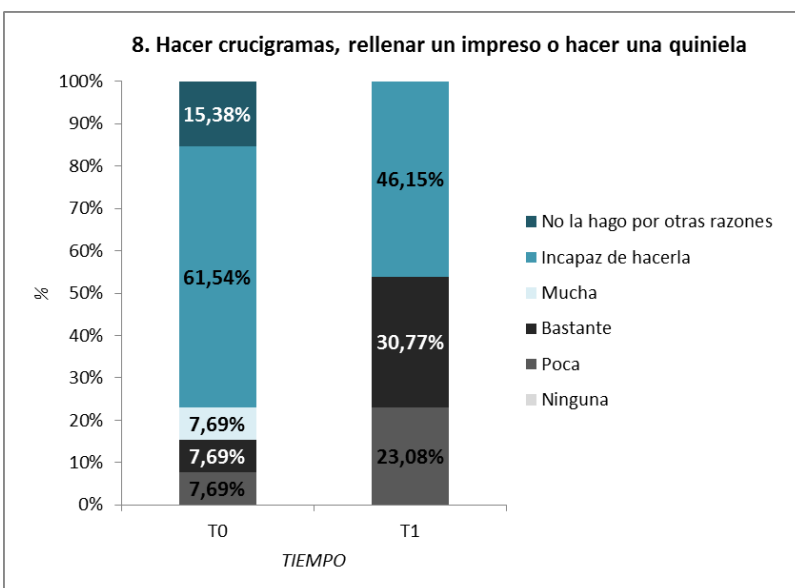


Figura 58. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 8 del cuestionario específico de función visual VF-14.

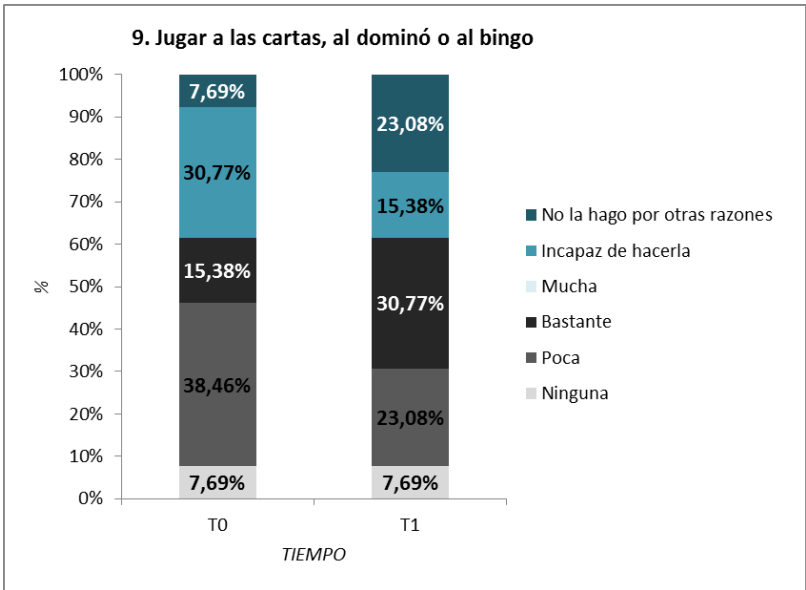


Figura 59. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 9 del cuestionario específico de función visual VF-14.

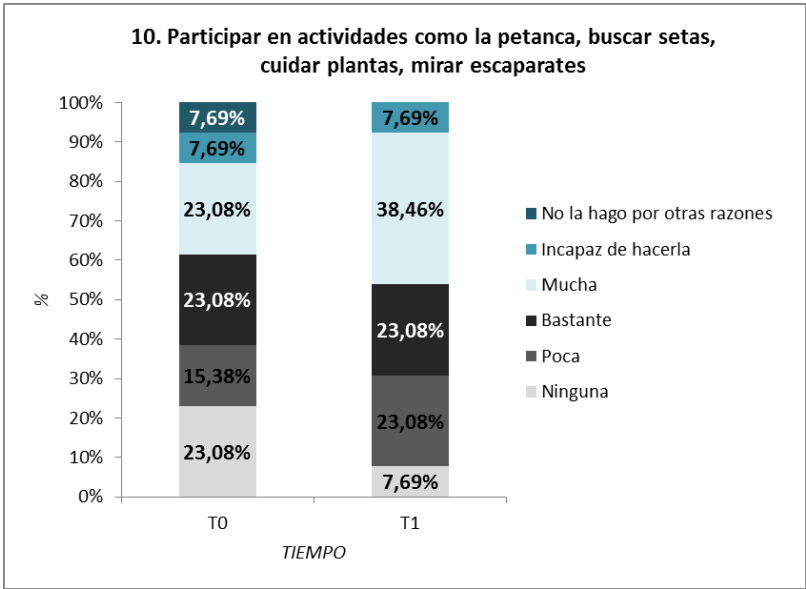


Figura 60. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 10 del cuestionario específico de función visual VF-14.

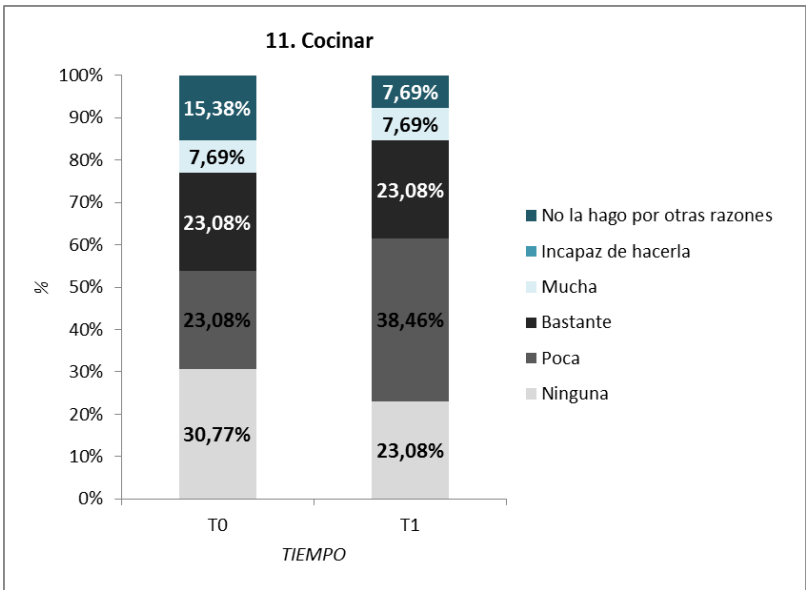


Figura 61. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 11 del cuestionario específico de función visual VF-14.

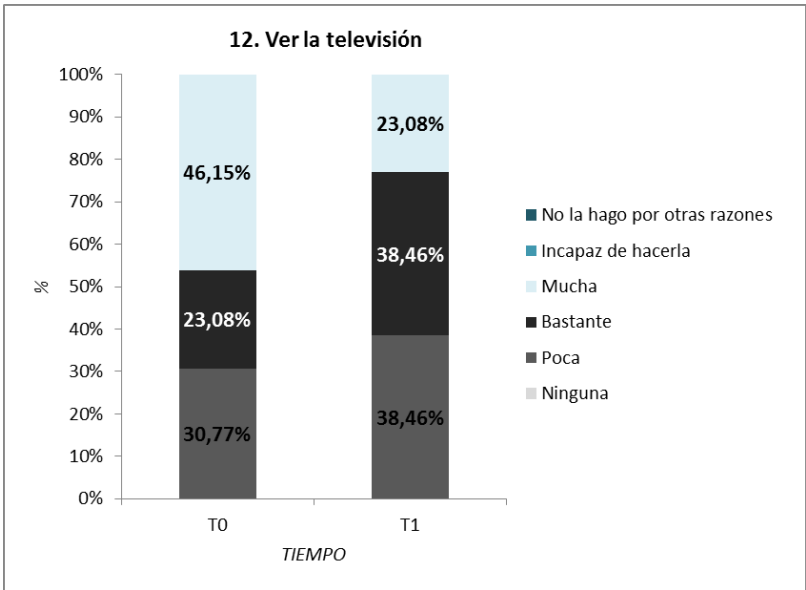


Figura 62. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 12 del cuestionario específico de función visual VF-14.

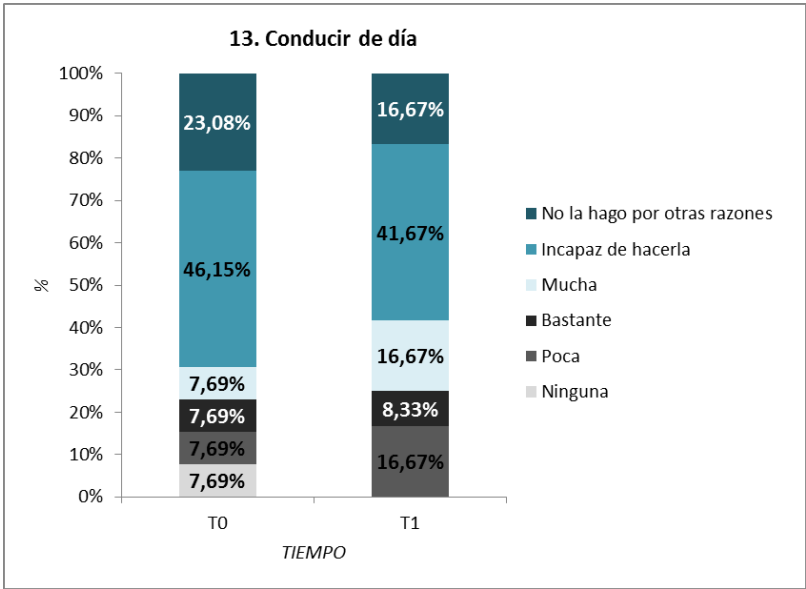


Figura 63. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 13 del cuestionario específico de función visual VF-14.

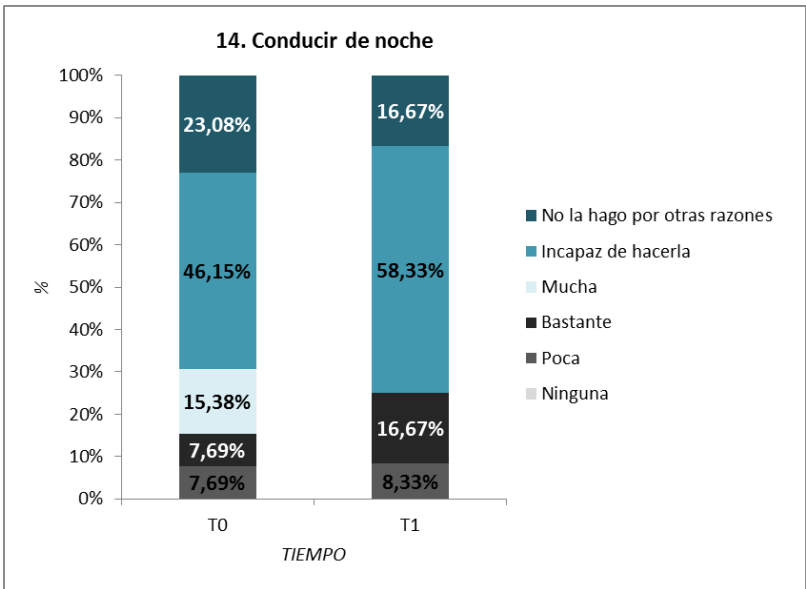


Figura 64. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 14 del cuestionario específico de función visual VF-14.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos para cada una de las preguntas tras el análisis estadístico.

CUESTIONARIO ESPECÍFICO DE FUNCIÓN VISUAL VF-14	
ITEM	P VALOR (Wi)
1	0,783
2	0,748
3	0,301
4	0,366
5	0,045
6	0,739
7	0,053
8	0,041
9	1,000
10	0,170
11	0,655
12	0,304
13	1,000
14	1,000

Tabla 43. Resumen de los resultados del test de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre y post-tratamiento con Somatulina en cada una de las preguntas del cuestionario específico de función visual VF-14.

Como puede observarse en los ítems 5 (**ver escalones, peldaños o el bordillo de la acera**) y 8 (**hacer crucigramas, rellenar un impreso o hacer una quiniela**) del cuestionario específico de función visual se ha encontrado una **mejoría estadísticamente significativa** tras el tratamiento con Somatulina. Además existe también una fuerte tendencia a la mejoría en el ítem 7 (hacer trabajos manuales finos como coser, arreglar un enchufe o clavar un clavo). Por lo que la incapacidad para realizar ciertas tareas disminuye con el tratamiento.

## 2.2.6 EFECTOS ADVERSOS

### 2.2.6.1 EFECTOS ADVERSOS LOCALES

En la siguiente tabla y gráfico se resumen los efectos adversos locales que se registraron durante el seguimiento.

EFECTOS ADVERSOS LOCALES					
VISITA	NINGUNO	DOLOR	CALOR	INDURACIÓN	ERITEMA
1M	10 (76,92%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (23,08%)	0 (0%)
2M	11 (84,62%)	1 (7,69%)	1 (7,69%)	2 (15,38%)	0 (0%)
3M	12 (92,31%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7,69%)	0 (0%)
6M	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
12M	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabla 44. Resumen de los efectos adversos locales observados en cada una de las visitas del estudio, representados como número de pacientes y porcentaje.

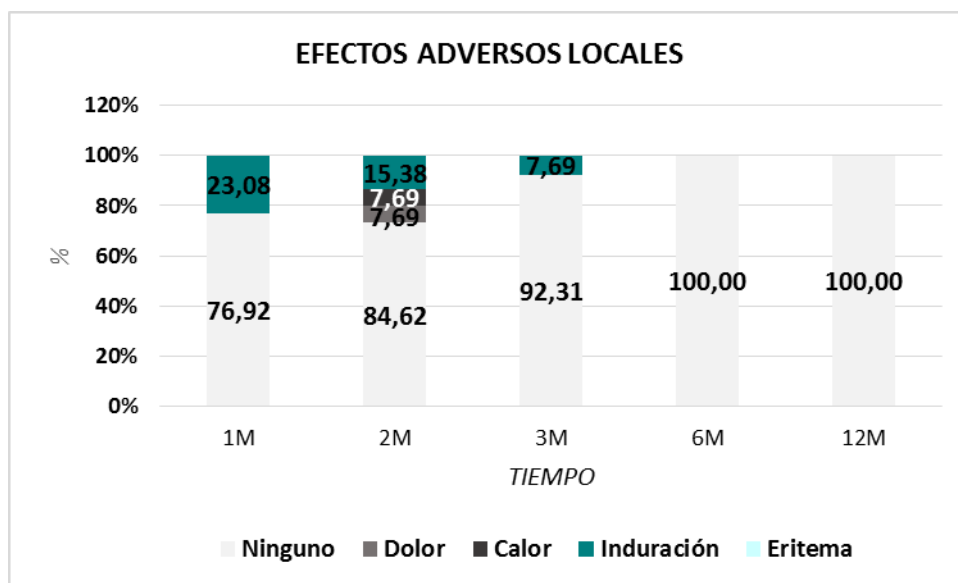


Figura 65. Representación gráfica del porcentaje de pacientes que presentaban efectos adversos locales en cada una de las visitas del estudio.

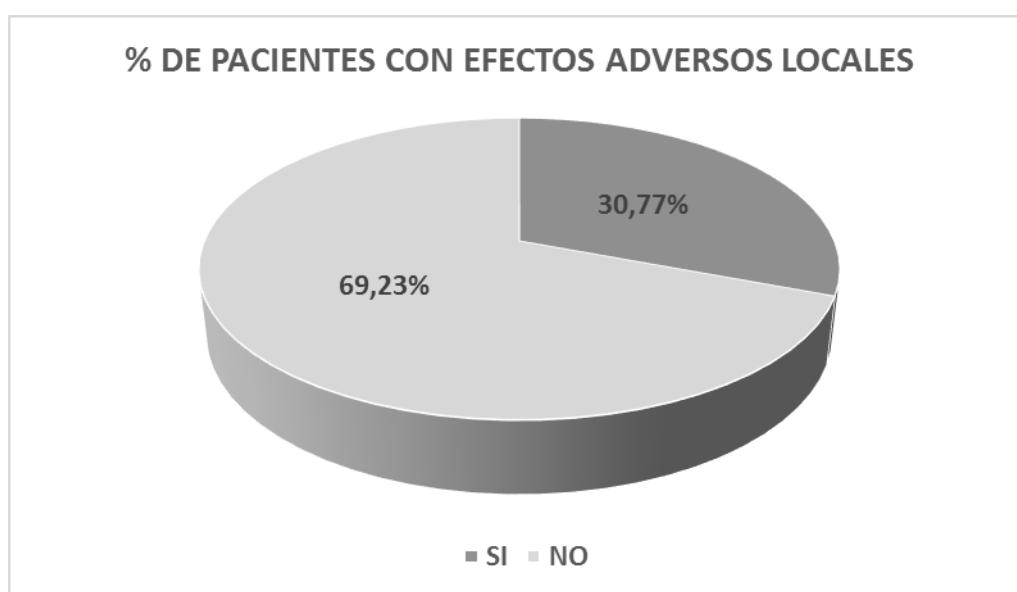


Figura 66. Representación gráfica del porcentaje de pacientes que presentaron algún efecto adverso local durante el seguimiento.

Durante los doce meses de tratamiento sólo cuatro de los trece pacientes (30,77%) presentaron algún efecto adverso local en alguna de las visitas de seguimiento. Los restantes nueve pacientes (69,23%) no presentaron efectos adversos locales.

El efecto adverso local más frecuente es la induración en la zona de la inyección de Somatulina, apareciendo en tres pacientes (23,08%) al primer mes de tratamiento, en dos pacientes (15,38%) al segundo mes y en un paciente (7,69%) al tercer mes. El segundo mes de tratamiento además de la induración, un paciente (7,69%) refirió dolor y calor en la zona de la inyección. Puede observarse una

tendencia a la disminución de efectos adversos locales con el tiempo de administración del tratamiento, no registrándose ningún nuevo efecto adverso local en las visitas de los seis y doce meses.

### 2.2.6.2 EFECTOS ADVERSOS SISTÉMICOS

A continuación se resumen los efectos adversos sistémicos que presentaron los pacientes durante el seguimiento.

EFECTOS ADVERSOS SISTÉMICOS						
VISITA	NINGUNO	DIARREA	METEORISMO	DOLOR ABDOMINAL	NÁUSEAS	HIPOGLUCEMIAS
1M	1 (7,69%)	10 (76,92%)	9 (69,23%)	5 (38,46%)	1 (7,69%)	2 (15,38%)
2M	3 (23,08%)	6 (46,15%)	8 (61,54%)	2 (15,38%)	2 (15,38%)	2 (15,38%)
3M	7 (53,85%)	4 (30,77%)	4 (30,77%)	1 (7,69%)	1 (7,69%)	3 (23,08%)
6M	8 (61,54%)	2 (15,38%)	4 (30,77%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7,69%)
12M	10 (76,92%)	1 (7,69%)	3 (23,08%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabla 45. Resumen de los efectos adversos sistémicos observados en cada una de las visitas del estudio, representados como número de pacientes y porcentaje.

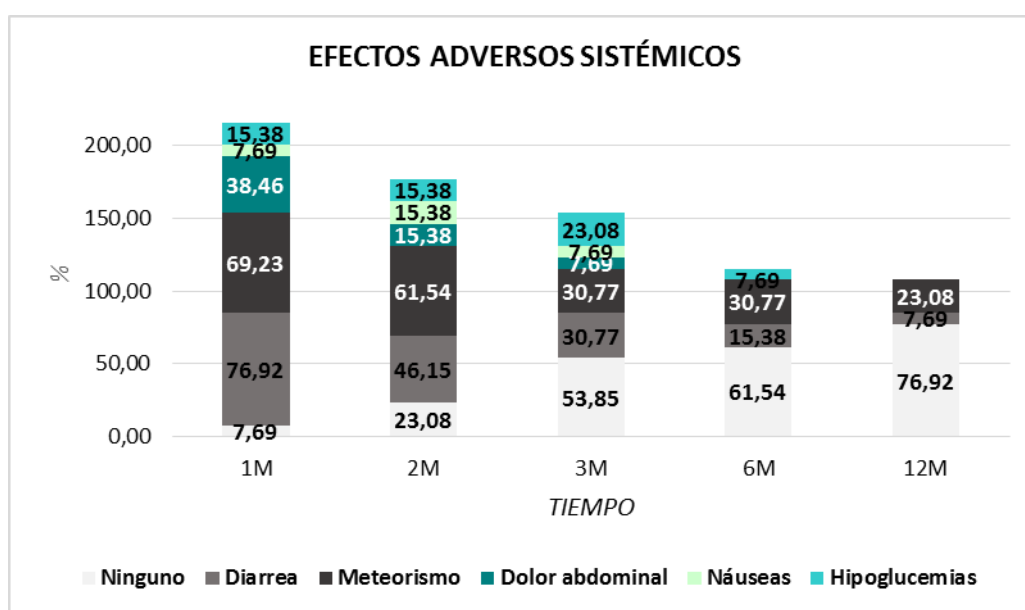


Figura 67. Representación gráfica del porcentaje de pacientes que presentaban efectos adversos sistémicos en cada una de las visitas del estudio.

A diferencia de los efectos adversos locales, todos los pacientes presentaron algún efecto adverso sistémico en alguna de las visitas de seguimiento. Sin embargo, puede observarse como el porcentaje de efectos adversos sistémicos disminuye progresivamente en las sucesivas visitas. Mientras que al primer mes de tratamiento sólo un paciente (7,69%) no mostró efectos adversos, en la visita de los doce meses esta cifra subió a diez (76,92%). Los efectos adversos más frecuentes son la diarrea y el meteorismo. Al primer mes de tratamiento diez pacientes (76,92%) referían tener diarrea y 9 (69,23%) meteorismo.

### **2.2.7 ABANDONOS**

Como se ha mencionado anteriormente 5 de los 18 pacientes inicialmente incluidos abandonaron el estudio antes de completar los doce meses de tratamiento, por lo que no se han incluido en el análisis estadístico. Dos de ellos decidieron dejar el tratamiento debido a los efectos adversos gastrointestinales y los tres restantes debido a otras patologías sistémicas concomitantes (pericarditis, fractura de miembro inferior e intervención de bypass cardíaco).



## DISCUSIÓN

La RD es una de las complicaciones de la diabetes más frecuentes y la principal causa de ceguera en individuos en edad laboral en los países desarrollados (Moss SE et al., 1998). Produce en promedio un 12% de nuevos casos de ceguera al año (Centers for disease control and prevention, 1996). Las dos entidades clínicas que van a determinar el pronóstico visual de los pacientes con RD son la RDP y el EMD, pudiendo conducir ambas a una pérdida de visión significativa. El EMD constituye la causa más frecuente de disminución de AV en los diabéticos y por otro lado la RDP es la responsable de los déficits visuales más severos.

Durante casi 30 años el tratamiento con láser focal o rejilla fue considerado el tratamiento de elección para el EM clínicamente significativo. Sin embargo, su efecto es limitado, ya que sólo consigue estabilizar la AV en el 50% de los pacientes y mejorarla en el 10% de ellos (The Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1981, Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group, 1985). Durante la última década, se han ido introduciendo por tanto otros tratamientos como los corticoides intravítreos o anti-VEGF con el fin de conseguir no sólo estabilizar sino recuperar la AV perdida en pacientes con EMD. La aplicación de estos tratamientos ha mejorado considerablemente el pronóstico visual de los pacientes diabéticos. Sin embargo un porcentaje de pacientes sigue desarrollando una pérdida considerable de su AV (Giuliari, 2012). Debido a ello se siguen buscando nuevos tratamientos que consigan reducir aún más la cifra de diabéticos que sufren pérdidas considerables en su capacidad visual.

El mejor conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad ha dado lugar a la búsqueda de tratamientos enfocados en frenar los mecanismos que desencadenan la RD como inhibidores de la PKC, inhibidores de la aldosa reductasa, sustancias que inhiben la formación de productos avanzados de la glicosilación o determinados factores de crecimiento y antioxidantes. La asociación entre la GH y la RD ha dado lugar por ejemplo al estudio de los análogos de la SST para el tratamiento de la RD. Varios estudios han observado la eficacia de estos fármacos para la tratar la RDP y el EMD en diferentes series de casos, siendo el octreótido el más utilizado (Boehm et al., 2001; Grant MB et al., 2000; Hernaez-Ortega et al., 2004; Hernaez-Ortega et al., 2008; Mallet et al., 1992; McCombe et al., 1991).

Por otra parte el estudio del estrés oxidativo ha ganado popularidad los últimos años, ya que como describió inicialmente Brownlee en 2001 podría ser el estímulo inicial que desencadene el resto de vías implicadas en la etiopatogenia de la RD (Brownlee, 2001; Nishikawa et al., 2000) (ver Figura 12). Por lo tanto mediante tratamientos que modulen el estrés oxidativo podríamos actuar también potencialmente sobre el resto de vías involucradas en la patogenia de la RD. Además en algunos modelos animales, el buen control glucémico después de un periodo de hiperglucemia, no revierte los efectos patológicos, lo que ilustra el concepto de “memoria metabólica” (Kowluru, 2003). Esto hace que una vez el insulto hiperglucémico ha pasado, persista el daño celular debido a que todas las moléculas dañadas no se han ido. La implicación del estrés oxidativo en el desarrollo de la RD con la formación de ROS puede ser la base del fenómeno de memoria metabólica (Williams et al., 2013). Estos hallazgos han

hecho que una de las vías de investigación más prometedoras en el daño vascular diabético sea el control de la generación de radicales libres mediante el uso de antioxidantes.

Los análogos de la SST pueden actuar a través de diferentes mecanismos: antiangiogénico, control de la barrera del EPR, anti-inflamatorio y neuroprotector. Sin embargo, los mecanismos por los que estos fármacos pueden regular la apoptosis son controvertidos, y su potencial papel para regular el estrés oxidativo no ha sido estudiado aún.

Por todo ello, el propósito de esta tesis fue analizar los mecanismos de actuación de uno de los análogos de la SST más recientes (Somatulina Autogel®) en la RD, en concreto su efecto sobre la apoptosis celular mediada por estrés oxidativo y sobre el VEGF, dada la importancia de ambos factores en la etiopatogenia de la RD. Por otro lado, en función de los resultados obtenidos en el estudio experimental, realizar un estudio clínico prospectivo para analizar la efectividad de la Somatulina en el tratamiento del EMD refractario a los tratamientos habituales en pacientes diabéticos.

## **1 ESTUDIO EXPERIMENTAL**

### **1.1 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL VEGF POR LA SOMATULINA**

La angiogénesis juega un papel principal en la progresión de la RD y sus complicaciones como la RDP, hemorragias vítreas o el glaucoma neovascular. Dentro de los diferentes factores angiogénicos el más estudiado hoy en día es el VEGF. Se ha establecido una relación significativa entre el desarrollo de la RDP y el VEGF (Kinnunen y Ylä-Herttuala, 2012). Varios estudios experimentales han confirmado el desarrollo de los cambios patológicos observados en la RD después de la inyección intravítrea de VEGF (Tolentino et al., 2002; Tolentino et al., 1996). Además se han encontrado niveles elevados de VEGF en pacientes con RDP comparados con pacientes con RDNP, disminuyendo después del tratamiento con láser (Aiello et al., 1994; Adamis et al., 1994).

#### **1.1.1 EXPRESIÓN DEL VEGF EN DIABÉTICOS**

En este trabajo hemos observado un aumento significativo de la expresión del VEGF en los cultivos celulares diabéticos en comparación con los cultivos controles no diabéticos (ver figura 22), siendo por lo tanto este hallazgo coherente con lo publicado anteriormente. Varios estudios han observado que en las fases tempranas de la diabetes existe un aumento de la expresión del VEGF en ratones y ratas diabéticas comparados con ratas controles (Obrosova et al., 2001; Zeng et al., 2009), así como también en pacientes diabéticos (Amin et al., 1997).

Estos resultados apoyan la teoría de que en la retina diabética los niveles del VEGF son mayores que en la retina sana, implicando que los procesos angiogénicos mediados por VEGF son una parte relevante del desarrollo de la RD.

### **1.1.2 PAPEL DE LA SOMATULINA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL VEGF**

El conocimiento del gran papel mediador del VEGF en la evolución de esta enfermedad ha permitido en estos últimos años desarrollar fármacos que inhiban su función (Giuliari et al., 2010), con la finalidad de mejorar el pronóstico visual de los pacientes con RD. En la actualidad los anti-VEGF se utilizan en múltiples situaciones en la retinopatía como en el EMD, la RDP, los hemovítreos persistentes el glaucoma neovascular o previamente a la vitrectomía, como se ha descrito en el apartado 1.8.3.

A los análogos de la SST se les ha atribuido también un papel antiangiogénico, siendo uno de los mecanismos principales por lo que pueden ser efectivos para el tratamiento de la RD. Varios estudios experimentales *in vitro* (Lawnicka et al., 2000) e *in vivo* (Danesi et al., 1997; Danesi y Del Tacca, 1996) han observado que los análogos de la SST reducen la proliferación de células endoteliales, la neovascularización en la RD (Grant MB et al., 2000; Lee et al., 1988; Mallet et al., 1992) y la retinopatía isquémica (Smith et al., 1997)

Se han descrito varios mecanismos para explicar este efecto antiangiogénico. Inicialmente se atribuyó a la inhibición sistémica del GH y IGF-1, que son factores proangiogénicos (Boehm, 2007; García de la Torre et al., 2002; Wilkinson-Berka et al., 2006). Sin embargo el papel de los niveles plasmáticos de IGF-1 en el desarrollo de RD es controvertido y dada la presencia de receptores para la SST en la retina y endotelio, se piensa que la efectividad de los análogos de la SST se debe más a un efecto directo al actuar sobre los receptores de SST. Se ha descrito un efecto antiproliferativo directo a través de la activación de los receptores de SST en las células endoteliales (Danesi et al., 1997; Lawnicka et al., 2000; Baldysiak-Figiel, 2004; Grant MB et al., 1993), o al actuar sobre los receptores y modificar la secreción de otros factores angiogénicos o antiangiogénicos como el IGF-I, PDGF, EGF o VEGF (Baldysiak-Figiel et al., 2004; Boehm, 2007; Davis et al., 2001; García de la Torre et al., 2002; Higgins et al., 2002).

Dada la importancia del VEGF en la patogenia de la RD y el auge de los tratamientos anti-VEGF para las complicaciones de la RD en este trabajo quisimos analizar el efecto de uno de los análogos de la SST más recientes, el Lanreotido Autogel®, sobre la expresión del VEGF en células del EPR humanas.

En nuestro estudio de investigación encontramos una reducción estadísticamente significativa del VEGF al tratar los cultivos celulares con Somatulina, tanto los controles, como los diabéticos (ver Figura 22). Esto coincide con la mayoría de estudios publicados anteriormente con otros análogos de la SST:

- Sall y colaboradores realizaron un estudio en cultivos de células ARPE-19 tratadas con octreotido y encontraron una disminución significativa en la expresión del VEGF dosis dependiente, comparado con el grupo control (Sall et al, 2004). Observaron que la disminución

del VEGF estaba mediada por la activación de los receptores sst2 que inhibían la vía del IGF-I y consecuentemente la producción de VEGF en las células del EPR.

- Dal Monte y colaboradores observaron también una disminución del VEGF con octreótido a través de los receptores sst2, pero utilizando un modelo experimental de retinopatía en ratones (Dal Monte et al., 2009).
- Lawnicka H y colaboradores por el contrario no encontraron relación entre la administración de octreotido o SST y la inhibición de la secreción del VEGF, en un modelo experimental usando células endoteliales de ratones (Lawnicka et al., 2000).

Del mismo modo estudios en células humanas de gliomas (Mentlein et al., 2001), células de tumores hipofisarios (Lawnicka et al, 2008) o en ratas con hipertensión portal (Mejias et al, 2008) apoyan la disminución del VEGF tras la administración de octreótido.

La mayoría de los estudios publicados, como hemos descrito se han realizado con el análogo de SST octreotido. En nuestro trabajo analizamos el papel de otro análogo de la SST más reciente de liberación prolongada, el Lanreótido Autogel®. Sólo se ha publicado otro estudio con Lanreotido en un modelo en ratas con endometriosis, en el que se observó también una disminución de los niveles de VEGF comparados con un grupo control (Sevket et al., 2013), siendo nuestro trabajo el primero realizado en células del EPR humanas.

Al analizar los niveles del VEGF en los diferentes grupos observamos además, que los niveles de VEGF en las células del EPR diabéticas tratadas con Somatulina ( $80,59 \pm 2,98$ ) era muy similar al de las células controles no diabéticas ( $79,45 \pm 4,85$ ). Podría argumentarse según esto que la S normaliza los niveles del VEGF en los diabéticos, volviendo estos a su estado basal antes de desarrollar la diabetes.

Nuestro estudio apoya por lo tanto el papel antiangiogénico de la S a través de una disminución en la expresión del VEGF en las células del EPR.

## **1.2 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE APOPTOSIS POR LA SOMATULINA**

Como ya se ha descrito anteriormente la apoptosis celular es un evento temprano en la RD, que tiene lugar antes de que el daño anatómico pueda detectarse mediante el examen de fondo de ojo (Kern et al., 2000; Mizutani et al., 1996). Este periodo de la enfermedad, antes de que sea evidente la retinopatía, nos proporciona por lo tanto una oportunidad para intervenir e intentar prevenir o retrasar la afectación de la AV.

Las investigaciones previas se han centrado sobre todo en la apoptosis de las células vasculares y células neurales retinianas (Barber et al., 2011) ya que ahí es donde se manifiestan las lesiones clínicas de la RD. Los ERG multifocales han detectado daño neuronal como predecesor al daño vascular visible

que tendría lugar 3 años más tarde en las mismas localizaciones (Ng JS et al., 2008). Este hallazgo sugirió por tanto que la apoptosis neuronal tiene lugar en estadios tempranos de la RD siendo responsable de los primeros defectos funcionales en la visión y condicionando el daño vascular posterior (Barber, 2003).

Sin embargo, pocos son los estudios que hayan analizado la apoptosis de las células del EPR en la retina diabética. El EPR es esencial para la supervivencia de la neuroretina y consecuentemente la conservación de una buena AV. Entre sus funciones principales destacan (Decanini et al., 2008; Simó et al., 2010):

- El transporte de nutrientes, iones y agua
- La absorción de luz para proteger a la retina del daño oxidativo
- Regeneración el cromóforo rodopsina
- Fagocitosis de los productos de desecho de los fotorreceptores
- Producción de factores de crecimiento esenciales para la integridad estructural de la retina
- Proporcionar del 60 al 80% de la glucosa necesaria para la retina
- Formar parte de la BHR externa, responsable de mantener el equilibrio estructural y fisiológico en la retina

Todo ello lo convierte en una estructura de vital importancia para la retina. En los últimos años se han observado varias anomalías en la estructura y función del EPR en la RD. En respuesta al daño causado por la hiperglucemia, las células del EPR migran y proliferan, dando lugar a una rotura en la adhesión entre las EPR y la coroides, seguido por una rotura de la BHR. Esto compromete el flujo sanguíneo dentro del EPR dando lugar a edema retiniano (Kennedy et al., 1995). Además este fenómeno desencadena la liberación de citoquinas, mediadores inflamatorios, proteínas y factores de crecimiento causantes de la RD (Kimoto et al., 2004).

La importancia por lo tanto de la integridad del EPR para la retina ha hecho que autores como Simó y colaboradores apuntaran la necesidad de explorar la actividad apoptótica en el EPR de la retina diabética e investigar nuevas estrategias terapéuticas para modular el daño del EPR (Simó et al., 2010). En este trabajo quisimos por lo tanto analizar la apoptosis celular en células de EPR de la línea ARPE-19 determinando la expresión de caspasa-3, uno de las proteasas esenciales ejecutoras de la apoptosis y aclarar el posible papel protector de la S frente a la apoptosis celular.

### **1.2.1 APOPTOSIS CELULAR DEL EPR EN DIABÉTICOS**

Tras el análisis inmunohistoquímico observamos en nuestro trabajo un aumento significativo de la expresión de caspasa-3 en el grupo diabético en comparación con el grupo control (ver Figura 24). Estos resultados parecen apuntar a que efectivamente existe una mayor apoptosis de las células del EPR en la retina diabética, implicando la vía de la caspasa-3. Estos hallazgos son coherentes con otros estudios previos en los que se observó que la apoptosis celular en las diferentes capas de la retina era mayor en las retinas diabéticas que en las no diabéticas (Carrasco et al., 2007) y que la expresión de caspasa-3

también era mayor (Hernández et al., 2013). Además el grupo de Carrasco encontró que la apoptosis era mayor en las células del EPR que en la neurorretina (Carrasco et al., 2007), resaltando la necesidad de realizar estudios en el futuro para evaluar mejor la importancia de la apoptosis del EPR en el desarrollo de la RD. De forma análoga otros autores han encontrado un aumento en la actividad de la caspasa-3 en células endoteliales y pericitos incubados en medios glucosados (Kowluru y Koppolu, 2002) y también en células ganglionares de la retinas de pacientes diabéticos (Abu-El-Asrar et al., 2004).

Dada la importancia del EPR para la supervivencia de la neurorretina como se ha descrito anteriormente, el incremento de apoptosis en estas células podría consecuentemente afectar al resto de la retina e influir por lo tanto en la progresión o desarrollo de la RD.

### **1.2.2 PAPEL DE LA SOMATULINA EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS DEL EPR**

El papel de la SST sobre la apoptosis celular es controvertido como se ha descrito en la introducción. Varios trabajos en células de tumores neuroendocrinos explican que la activación de los receptores sst1, sst4 y sst5 da lugar a la detención del ciclo celular y la activación de sst2 y sst3 a la inducción de apoptosis, lo que podría explicar el efecto antiproliferativo sobre las células endoteliales (Davis et al., 2001; Ferjoux et al., 2000; Kvols y Woltering, 2006). Sin embargo otros autores en un trabajo más reciente en un modelo de retinopatía isquémica en ratones observaron una reducción de la apoptosis en los ratones con mayor expresión de sst2, sugiriendo un papel protector frente a la apoptosis neuronal de la SST. Los mecanismos neuroprotectores son muy complejos y hay poco consenso en los mecanismos de acción de los análogos de la SST a nivel celular, variando la respuesta según el tipo celular. Por ello debería evaluarse la señalización de los receptores sstr en cada tipo celular individual, ya que los efectos pueden ser muy diferentes (Davis, 2001).

En las células del EPR evaluadas en el presente trabajo observamos como las muestras diabéticas que fueron tratadas con S, presentaban una disminución en la expresión de caspasa-3 estadísticamente significativa en comparación con las muestras diabéticas que no recibieron tratamiento. Con ello se puede deducir que la S puede tener un efecto protector frente a la apoptosis de las células del EPR diabéticas, pudiendo ser un mecanismo de actuación más que explique su eficacia en el tratamiento de la RD.

El grupo de Carrasco E. estudió los niveles de SST en la neurorretina y EPR en ojos de pacientes diabéticos sin RD clínica aparente, comparados con ojos controles y observaron que los niveles de SST eran significativamente menores en los diabéticos (Simó et al., 2002) y que existía una fuerte correlación inversa entre la concentración de SST y el porcentaje de apoptosis. A menor concentración de SST mayor apoptosis celular, sin quedar claro sin embargo si la disminución de SST es una causa o consecuencia de la apoptosis celular. Esto les llevó a sugerir que la SST juega un papel importante en la homeostasis retiniana, y que su déficit es un acontecimiento temprano en los diabéticos, que se asocia a apoptosis celular y que puede contribuir al desarrollo de la RD.

Por ello la administración de análogos de la SST en la retina diabética como se observa en nuestro trabajo, podría normalizar los niveles de SST para devolver la homeostasis a la retina. Con ello se podría

reducir la apoptosis celular y disminuir potencialmente el daño retiniano y la progresión de la RD. En nuestro trabajo la expresión de caspasa-3 en las células diabéticas tratadas con Somatulina era de hecho bastante similar a las células controles, por lo que podría decirse que la apoptosis del EPR vuelve al estado de la retina sana con el tratamiento con Somatulina. En un reciente trabajo se evaluó la administración de SST tópica en ratas diabéticas para prevenir la neurodegeneración retiniana (Hernández et al., 2013). Observaron que la administración de SST disminuía de forma significativa la apoptosis en todas las capas de la retina, así como la expresión de caspasa-3, comparadas con las ratas tratadas con placebo. De forma análoga a nuestro trabajo, notaron que el grado de apoptosis en las ratas diabéticas tratadas con SST tenía valores similares al de las ratas no diabéticas.

### **1.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SOMATULINA SOBRE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO**

El aumento de apoptosis celular en la retina diabética puede desencadenarse por diferentes factores: la hiperglucemia, la excitotoxicidad por glutamato, la falta de factores de crecimiento, la inflamación o el estrés oxidativo (Barber et al., 2011). El estrés oxidativo está por lo tanto íntimamente relacionado con la apoptosis celular en la diabetes. Como se ha descrito anteriormente se han demostrado episodios de apoptosis inducidos por estrés oxidativo que dan lugar a anomalías en la retina, cambios en los potenciales evocados visuales y los primeros cambios vasculares observados en la RD (Kowluru, 2005; Lopes de Faria et al., 2001).

Las células del EPR debido a su función como depuradoras de los productos de desecho de los fotorreceptores, están constantemente expuestas a numerosas especies ROS como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Miceli et al., 1994), por lo que se han utilizado para explorar insultos mediados por estrés oxidativo y factores protectores del daño oxidativo en una serie de estudios recientes (Cao et al., 2012; Geiger et al., 2005). En este trabajo utilizamos células de EPR para evaluar si la S puede ejercer también algún papel en la regulación del estrés oxidativo en la retina diabética. Para ello analizamos la expresión de JNK, uno de los marcadores fuertemente asociado a la apoptosis celular desencadenada por estrés oxidativo (Du et al., 2013).

#### **1.3.1 ESTRÉS OXIDATIVO EN DIABÉTICOS**

Varios trabajos demuestran elevaciones específicas de diversos marcadores del estrés oxidativo en pacientes diabéticos, pero además de manera más específica en aquellos que presentan RD (Akgull E, 1997). Como se ha explicado anteriormente, los diabéticos presentan una reducción importante en la defensa total antioxidante y una depleción de antioxidantes (Vlassara y Palace, 2002; Miranda M et al., 2007; Kowluru y Chan, 2007; Williams et al., 2013). Este ambiente pro-oxidante hace que la retina de los diabéticos sea susceptible a un mayor daño por estrés oxidativo.

En las muestras diabéticas de nuestro trabajo la expresión de JNK era significativamente mayor que en las muestras controles (ver Figura 26). Esta observación nos permite sugerir de forma análoga a lo



descrito anteriormente que el daño celular por estrés oxidativo es mayor en los diabéticos comparados con los controles sanos.

### 1.3.2 PAPEL DE LA SOMATULINA EN LA REGULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Los estudios realizados previamente con los análogos de la SST no han evaluado si entre sus mecanismos de acción está regular el daño por estrés oxidativo. En nuestro trabajo observamos una disminución significativa en la expresión de JNK en el grupo de diabéticos tratados con S frente a los diabéticos que no recibieron el tratamiento (ver Figura 26), alcanzando valores similares al del grupo control. Esto se traduce en una menor apoptosis de las células del EPR por estrés oxidativo, con lo que podríamos esperar de los análogos de la SST, además de sus mecanismos de acción anteriores, un efecto antioxidante.

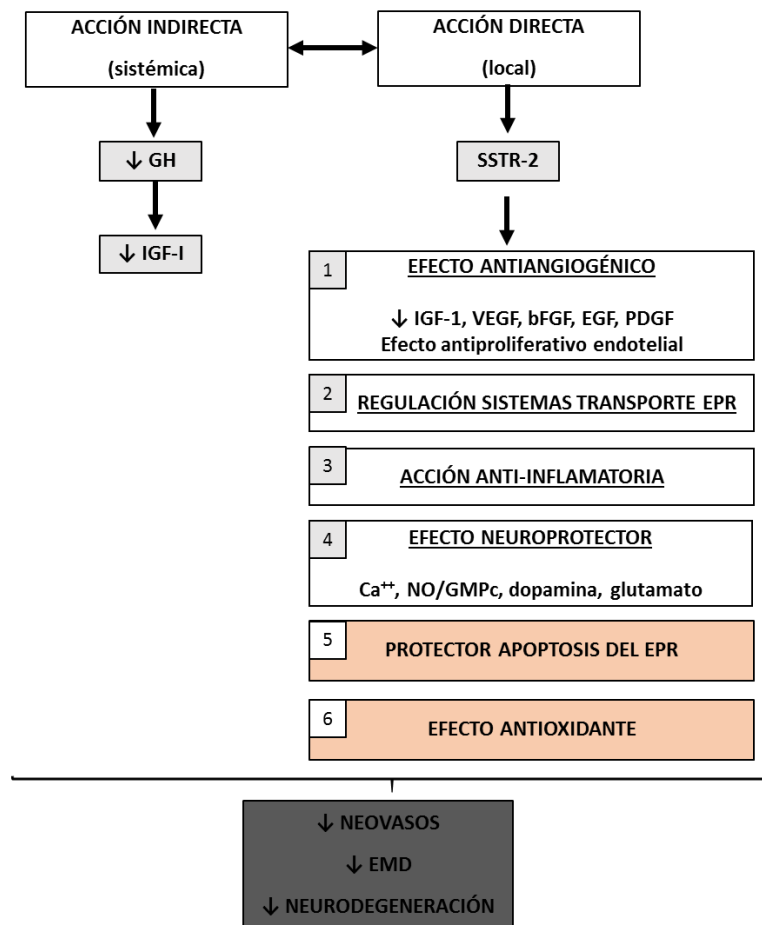


Figura 68. Representación de los mecanismos de acción de los análogos de la SST descritos previamente por otros autores junto los nuevos mecanismos que aportamos en este trabajo (5 y 6).

## 1.4 RELACIÓN ENTRE VEGF, ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS

### 1.4.1 RELACIÓN ENTRE VEGF Y ESTRÉS OXIDATIVO

Se ha descrito una relación causal entre el estrés oxidativo y la expresión de VEGF (Obrosova et al., 2001). Así, se ha encontrado con el 4-hidroxinonenal, un producto de la peroxidación lipídica con gran actividad biológica, que es capaz de incrementar la expresión de VEGF en humanos (Ayalasomayajula SP, 2002). Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo está directamente involucrado en la regulación del VEGF en las fases tempranas de la RD. Esto se ha deducido de diferentes observaciones:

- Existe una fuerte correlación entre los productos de peroxidación lipídica y la concentración del VEGF en pacientes con RDP (Augustin AJ, 2000).
- Las ROS actúan como segundos mensajeros en la migración endotelial inducida por VEGF, un paso clave en la neovascularización (Wang et al., 2011).
- En un modelo animal de DM en ratones, la inhibición de la NADPH oxidasa, además de prevenir la formación de superóxido, normalizaba los niveles de VEGF en retina (Al-Shabrawey et al., 2005).

La regulación de la expresión del VEGF es compleja y depende de diferentes estímulos así como del tipo celular. En células del EPR se ha descrito que la JNK tiene un importante papel en la estabilización del mRNA del VEGF, prolongando su supervivencia (Pagès et al., 2000). También se ha observado que la expresión del VEGF inducida por IGF-I depende de la JNK (Poulaki et al., 2004). Otros autores encontraron por el contrario que la activación de JNK por estrés oxidativo inhibe la secreción de secreción de VEGF (Gerald et al., 2004).

En este trabajo al analizar la correlación entre los diferentes marcadores estudiados encontramos una fuerte correlación positiva entre los niveles de JNK y VEGF ( $r=0,892$ ). Esto coincide con lo publicado en anteriores trabajos en los que se observó una relación entre estos dos marcadores. El grupo de Guma observaron una fuerte relación entre la JNK y la angiogénesis. En un estudio en un modelo en ratones con retinopatía del prematuro observaron (Guma et al., 2009) que los ratones que carecían de JNK1 mostraban una reducción de la angiogénesis y menor nivel de producción de VEGF. Además la inyección intravítrea de un inhibidor de JNK reducía la expresión retiniana de VEGF y consecuentemente la neovascularización retiniana, representado una nueva diana terapéutica para patológicas en las que la angiogénesis juega un papel principal. Encontraron por lo tanto que JNK es un factor crítico para la producción de VEGF inducida por hipoxia y angiogénesis, como sería el caso de la RDP.

Por lo tanto la disminución de VEGF que producen los análogos de la SST podría explicarse por la disminución en la expresión de JNK.

### 1.4.2 RELACIÓN ENTRE JNK Y APOPTOSIS

Las ROS causan la activación de JNK y con ello la muerte celular (Kamata et al., 2005). Sin embargo el papel exacto de la vía JNK en apoptosis es altamente controvertido y ha habido mucha especulación en si es pro o antiapoptótica. Las consecuencias de la activación de JNK dependen del tipo celular, tipo de estímulo y la influencia de otras vías activadas, por lo que la vía de JNK no es simplemente pro o antiapoptótica (Cao et al., 2012).

El grupo de Du observó que la JNK jugaba un papel importante en relacionar el estrés oxidativo, apoptosis y producción de VEGF. Observaron que la deficiencia de JNK reducía de forma significativa el número de células apoptóticas (Du et al., 2013), además de disminuir la expresión de VEGF y neovascularización coroidea en un modelo en ratones con degeneración macular asociada a la edad. De forma similar en este trabajo observamos una correlación muy positiva entre los niveles de caspasa-3 y JNK ( $r=0,999$ ) aunque sin alcanzar la significancia estadística. La inhibición de la vía de JNK da lugar a una reducción en la apoptosis de las células del EPR.

Nuestros resultados sugieren por lo tanto la siguiente relación entre los diferentes marcadores analizados y el tratamiento con S:

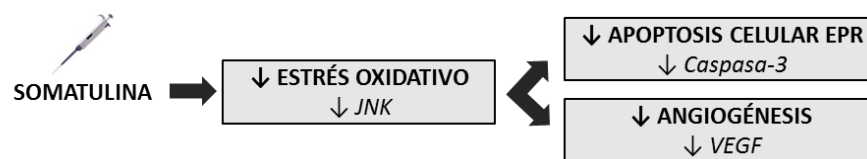


Figura 69. Representación de la relación entre los diferentes marcadores estudiados en este trabajo. La disminución de la JNK implica una menor apoptosis celular y una disminución en la expresión del VEGF en el EPR. La administración de somatulina produce una disminución en los tres marcadores.

Por todo lo expuesto anteriormente, parece que los análogos de la SST pueden ser eficaces para tratar la RD debido a su efecto antiangiogénico al regular la expresión del VEGF, su efecto protector de la apoptosis celular del EPR y su efecto antioxidante, pudiendo ser un tratamiento efectivo al actuar sobre diferentes vías implicadas en la patogenia de la RD.

## 2 ESTUDIO CLÍNICO

El EMD tiende a ser una enfermedad crónica en la que a pesar de que en el 33-35% de los pacientes se puede resolver espontáneamente al cabo de 6 meses con control glucémico y de factores de riesgo, el resto requieren tratamiento para su control (Romero-Aroca, Reyes-Torres, Baget-Bernaldiz, & Blasco-Suñe, 2014). Aunque inicialmente el láser era el tratamiento de elección del EMCS, durante la última década varios ensayos clínicos aleatorizados, prospectivos han proporcionado nivel de evidencia A para el uso de anti-VEGF en el tratamiento del EMD, cambiando los protocolos de tratamiento estándares para el EMD. Las últimas recomendaciones sobre el tratamiento del EMD publicadas recientemente por el “Diabetic Macular Edema Treatment Guideline Working Group” (Mitchell et al., 2014) junto con las de la Sociedad Española de Retina y Vítreo (López-Gálvez y García-Campos, 2012) aconsejan lo siguiente (Figura 70):

- A) Los pacientes en los que el EMD no tenga afectación central o si su AV es mayor a 20/30 pueden ser tratados únicamente con láser siguiendo las guías del ETDRS.
- B) Los resultados de los diferentes estudios avalan el uso de los anti-VEGF en los EMD con afectación central y  $AV \leq 20/30$ .
- C) En determinados pacientes podría utilizarse el tratamiento con anti-VEGF aún con AV mayores a 20/30 aunque faltan estudios que lo avalen.

El estudio RESTORE además observó que en ojos con un espesor retiniano central menor a 300  $\mu\text{m}$  la respuesta a los anti-VEGF era similar al láser y entre 300 y 400  $\mu\text{m}$  sólo levemente superior, por lo que algunas guías recomiendan el uso de anti-VEGF sólo en casos de espesor central mayor a 400  $\mu\text{m}$  (Stewart, 2014). En cuanto al uso de anti-VEGF en monoterapia o asociados al láser en los edemas centrales, queda a criterio del oftalmólogo, ya que según algunos estudios su uso disminuye el número de inyecciones. El momento de aplicar el láser tampoco está del todo bien definido, pudiendo existir 2 posibles alternativas: administrarlo 7-10 días antes de la primera inyección o de forma diferida una vez alcanzada la estabilización, sin existir de momento evidencia que apoye más una pauta que otra.

- D) En cuanto a las pautas de tratamiento, se recomiendan 3 inyecciones mensuales iniciales de carga, seguidas de seguimiento mensual e inyecciones repetidas según AV y OCT hasta lograr la estabilidad del EMD. A continuación podrían espaciarse las visitas de seguimiento entre 2 y 4 meses, reanudado el tratamiento en caso de que el EMD reaparezca o empeore la AV. Serían necesarios más estudios que comparen el coste de los tratamientos, la carga asistencial y los resultados en AV y calidad de vida para definir mejor el número de inyecciones y visitas de seguimiento.

- E) Si la respuesta a los anti-VEGF o láser no es buena en caso de pacientes pseudofáquicos se pueden utilizar corticoides.
- F) En los EMD con componente traccional puede estar indicada una vitrectomía, acompañada o no de anti-VEGF o corticoides.

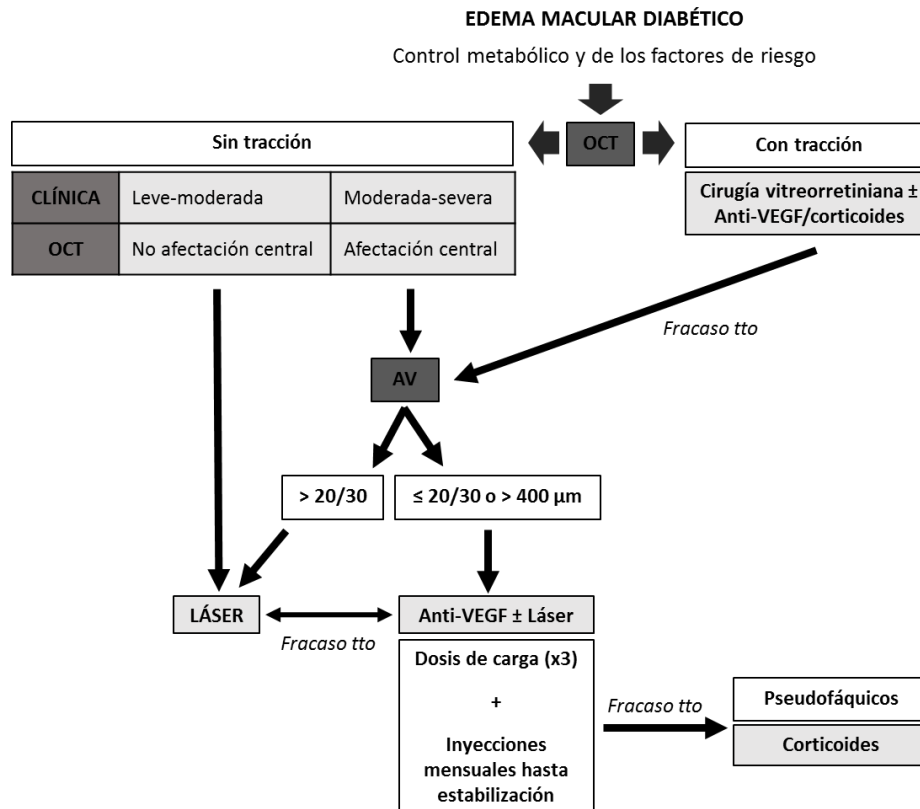


Figura 70. Esquema que resume las guías de tratamiento actuales del EMD.

La introducción de los anti-VEGF en el tratamiento del EMD ha mejorado considerablemente el pronóstico visual de estos pacientes y reducido el número de EM persistentes. Los buenos resultados publicados recientemente con aflibercept (Korobelnik et al., 2014), apuntan a que la cifra de EM refractarios siga disminuyendo. Sin embargo, sigue existiendo un porcentaje de pacientes no respondedores que no mejoran o incluso siguen perdiendo AV. Los dispositivos de liberación prolongada de acetónido de fluocinolona (Iluvien®) son una alternativa terapéutica en EM persistentes (Cunha-Vaz et al., 2014) pero están limitados por sus efectos adversos oculares (catarata a hipertensión ocular). Con el último dispositivo de liberación prolongada de dexametasona (Ozurdex®) se han reducido los casos de hipertensión ocular (Boyer et al., 2014) pero sus efectos en EM refractarios sólo están respaldados por estudios retrospectivos o prospectivos con un pequeño número de pacientes y cortos periodos de tiempo de seguimiento (Lazic et al., 2014). Por otro lado, el papel de la vitrectomía como tratamiento en los EMD refractarios en ausencia de tracción no está del todo claro variando los resultados según estudios (Simunovic et al., 2014).

Por todo ello se ha seguido intentando buscar otras alternativas terapéuticas para aquellos ojos que no respondan a los tratamientos disponibles actualmente entre las que se encuentran:

- Bevacizumab asociado a triamcinolona subtenoniana y láser (Chan et al., 2012)
- Bevacizumab asociado a triamcinolona intravítrea (Shoeibi et al., 2013; Yolcu & Sobaci, 2014)
- Vitrectomía asociada a triamcinolona intravítrea y láser (Kim et al., 2012).
- Bevacizumab asociado a Fasudil intravítreo, (inhibidor de la vía Rho/Rock que se ha visto aumentada en pacientes diabéticos) (Nourinia et al., 2013)
- Activador tisular del plasminógeno (TPA) (Abrishami et al., 2011)
- Eritropoyetina intravítrea (Li W et al., 2010)
- Inhibidores del factor de necrosis tumoral (infiximab o adalimumab) intravítreos (Wu et al., 2011) o intravenosos (Sfikakis et al., 2010)

Sin embargo, no existen estudios prospectivos y aleatorizados con un elevado número de pacientes que nos aclaren su verdadera eficacia.

La implicación de la GH en la RD llevó también a iniciar múltiples ensayos clínicos con SST y sus análogos para inhibir este factor de crecimiento. Se ha observado que la administración de octreótido en pacientes con RD ha reducido la progresión a RDP (Grant MB et al., 2000), reducido la neovascularización (Mccombe, 1991) y hemovítreos (Boehm et al., 2001) en la RDP, estabilizando o mejorando la AV de los pacientes diabéticos en varias series de casos. El grupo de Hernaez-Ortega y colaboradores ha publicado además resultados preliminares que describían la eficacia del octreótido (Hernaez-Ortega et al., 2004) y lanreótido (Hernaez-Ortega et al., 2008) para el tratamiento del EMD resistente al tratamiento estándar en tres pacientes, aunque únicamente observando mejorías en el espesor macular que no se traducían en mejorías en la AV. Por otro lado, otras publicaciones describen también la eficacia del octreótido en EM de diferente origen como el EM uveítico (Kafkala et al., 2006; Missotten et al., 2007; Papadaki et al., 2005; van Hagen et al., 2000), EM postquirúrgico (Shah et al., 2010) o idiopático (Kuijpers et al., 1998; Rothova, 2002).

Desde la introducción de los anti-VEGF y corticoides en el tratamiento del EMD la investigación en el campo de los análogos de la SST en la RD se ha visto reducida. Sin embargo, debido a los buenos resultados preliminares descritos por Hernaez-Ortega y tras observar las múltiples vías de acción de la Somatulina en nuestro estudio experimental, decidimos iniciar otro estudio para evaluar su eficacia clínica en EMD refractarios a anti-VEGF, corticoides y vitrectomías.

## **2.1 EFECTIVIDAD LA SOMATULINA AUTOGEL PARA EL TRATAMIENTO DEL EMD REFRACTARIO**

### **2.1.1 GANANCIA DE AGUDEZA VISUAL**

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la Somatulina Autogel proporciona una mejoría de la AV en EM crónicos que no habían respondido a otros tratamientos. La ganancia media en número de letras al año de tratamiento fue de 8,62 letras ( $p=0,002$ ). Desde tan sólo el primer mes de

tratamiento puede observarse ya una ganancia media de 3,65 letras, y ésta va aumentando de forma progresiva a lo largo de los 12 meses, habiendo sólo un descenso medio entre el segundo y tercer mes de 1,23 letras. De los 26 ojos incluidos en nuestro estudio, 20 (76,9%) mejoraron su AV y 7 de ellos (26,9%) ganaron una cantidad mayor o igual a 15 letras.

En la actualidad las alternativas terapéuticas en EMD persistentes con más evidencia científica son los dispositivos de liberación prolongada de corticoides y el aflibercept, por lo que partiremos de sus resultados para compararlos con los de este trabajo. En la siguiente tabla representamos los resultados visuales de los estudios más relevantes con los tratamientos mencionados anteriormente, junto con los nuestros (última fila), teniendo en cuenta que nuestro grupo de pacientes había sido refractario a los primeros:

FÁRMACO	ESTUDIO (nº ojos)	TIEMPO DE SEGUIMIENTO (meses)	RAMAS DE TTO	GANANCIA MEDIA DE AV HASTA FIN DE SEGUIMIENTO (nº letras)	GANANCIA $\geq$ 15 LETRAS HASTA FIN DE SEGUIMIENTO (%)
Aflibercept (Abt)	DA VINCI (221)	12	Abt 0,5mg/4s	11,0	40,9
			Abt 2mg/4s	13,0	45,5
			Abt 2mg/8s	9,7	23,8
			Abt 2mg PRN	12,0	42,2
	VISTA (459)	12	Abt 2mg/4s	12,5	41,6
			Abt 2mg/8s	10,7	31,1
VIVID (403)	12	Abt 2mg/4s	10,5	32,4	
		Abt 2mg/8s	10,7	33,3	
Acetónido de fluocinolona (F)	Pearson et al. 2011 (196)	36	F 0,59mg	-	31,1
	FAME (956)	36	F 0,2 $\mu$ F 0,5 $\mu$	5,3 5,3	28,7 27,8
	FAME con EM crónico (209)	36	F 0,2 $\mu$	7,6	31,8 (FAME A) 36,4 (FAME B)
Liberación prolongada dexametasona (O)	MEAD (1048)	36	O 0,7mg	3,5	22,2
			O 0,35mg	3,6	18,4
	BEVORDEX (88)	12	O 0,7mg	5,7	22,0
Somatulina Autogel (S)	Fernández-López E et al. (26)	12	S 90mg/4s	8,62	26,9

Tabla 46. Resumen de los resultados visuales de los principales estudios con tratamientos utilizados para EMD persistentes, junto con los obtenidos en esta tesis.

Debido a diferencias en el tiempo de seguimiento, el número de tratamientos recibidos previamente y duración del EM es difícil realizar comparaciones con los demás estudios. Sin embargo puede observarse como la ganancia de letras media, así como el porcentaje de ojos que ganaron  $\geq$  15 letras con Somatulina al año de tratamiento es similar o superior a la obtenida con los dispositivos de liberación prolongada de corticoides, siendo superada tan sólo por el aflibercept, cuyas ganancias medias rondan las 9,7-13 letras al año y entre el 23,8-45,5% de los ojos ganan  $\geq$  15 letras. Podría pensarse que la AV final en los estudios con dispositivos de liberación de corticoides esté afectada por el desarrollo de cataratas durante el periodo de tratamiento, sin embargo la ganancia media de letras en estudio MEAD en el subgrupo de pacientes pseudofáquicos eran de 6,1 y 6,2 letras para los implantes de 0,7mg y 0,35mg respectivamente, sin superar nuestra ganancia obtenida con Somatulina. Además, cabe destacar como ya hemos establecido, que en nuestro estudio se trata de EM crónicos que no respondieron a otros tratamientos mientras que los demás estudios incluían también pacientes que no habían sido tratados previamente con otras terapias. Los ojos que incluimos en este trabajo parten de AV de base muy inferiores (18 letras de media) a las de los demás estudios.

Faltan estudios prospectivos y multicéntricos que definan mejor los resultados de los diferentes tratamientos en el EMD crónicos o refractarios. La mayor serie publicada hasta el momento proviene de un subgrupo de 209 pacientes de los estudios paralelos FAME A y B con EM crónicos (de más de 3 años de duración) tratados con el dispositivo de liberación prolongada de fluocinolona (Iluvien®) de 0,2µg. A los tres años observaron una ganancia media de 7,6 letras con un 31,8% en FAME A y 36,4% en FAME B de pacientes que mejoraron  $\geq 15$  letras, con lo que la mejoría en AV es más evidente en el subgrupo de ojos con edemas crónicos comparados con los no crónicos (Cunha-Vaz et al., 2014).

En los estudios de Pearson y colaboradores y el estudio FAME que han publicado resultados a 36 meses de seguimiento la mejoría en número de letras ganadas y porcentaje de ojos que mejoran  $\geq 15$  letras aumenta de forma progresiva cada año de tratamiento. En el estudio de Pearson por ejemplo el porcentaje de ojos que mejoran  $\geq 15$  letras era de 16,4% el primer año, aumentando hasta 31,1% a los tres años (Pearson et al., 2011). En este trabajo sólo presentamos resultados a doce meses de tratamiento, por lo que si continuáramos administrando Somatulina y el cambio en AV siguiera la misma tendencia ascendente como se observa en la curva de la gráfica de la evolución de la AV (Figura 33), podría incluso aumentar con el seguimiento la ganancia visual.

Por otro lado, en el análisis subjetivo de la función visual a través del cuestionario VF-14, a pesar de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas antes y después del tratamiento en la puntuación global, sí que se encontraron diferencias para determinados ítems, disminuyendo la incapacidad para realizar ciertas tareas con el tratamiento.

En cuanto a las pérdidas de visión en nuestro estudio, de los 6 ojos que no mejoraron su AV, sólo 2 ojos perdieron una cantidad mayor o igual a 10 letras, tratándose de un paciente que presentaba un mal control glucémico y en el que aunque el EM no mejoró con la Somatulina desarrolló también cataratas a lo largo del estudio.

### **2.1.2 MEJORÍA DEL EDEMA MACULAR**

En este trabajo se ha observado como el EM mejora de forma progresiva con el tratamiento con Somatulina. En el 92,31% de los ojos con OCT-Cirrus y el 76,9% con OCT-Stratus disminuye el espesor macular central. El espesor macular central medio medido con Cirrus-OCT antes de comenzar el tratamiento era de 478,12 µm, reduciéndose a 372,15 µm a los 12 meses de tratamiento, disminuyendo por tanto 106 µm ( $p=0,001$ ). Con OCT-Stratus también fue estadísticamente significativa la reducción del espesor central aunque algo inferior (-92,9 µm). De forma análoga disminuyó también el volumen macular -1,25 mm<sup>3</sup> con Cirrus-OCT ( $p=0,001$ ) y -1,19 mm<sup>3</sup> con Stratus-OCT ( $p=0,001$ ), así como el volumen foveal en -0,07 mm<sup>3</sup> con ( $p=0,002$ ) con Stratus OCT. En la siguiente tabla se resume los cambios en espesor macular central medio en los estudios más relevantes publicados hasta la fecha con aflibercept y dispositivos de liberación prolongada de corticoides, junto con los de este trabajo (última fila).



FÁRMACO	ESTUDIO (nº ojos)	TIEMPO DE SEGUIMIENTO (meses)	RAMAS DE TTO	REDUCCIÓN MEDIO DE GCR HASTA FIN DE SEGUIMIENTO ( $\mu\text{m}$ )
Aflibercept (Abt)	DA VINCI (221)	12	Abt 0,5mg/4s	165,4
			Abt 2mg/4s	222,4
			Abt 2mg/8s	187,8
			Abt 2mg PRN	180,3
	VISTA (459)	12	Abt 2mg/4s	185,9
			Abt 2mg/8s	183,1
VIVID (403)	12	Abt 2mg/4s	195,0	
		Abt 2mg/8s	192,4	
Acetónido de fluocinolona (F)	FAME (956)	36	F 0,2 $\mu$	181,0
	FAME con EM crónico (209)	36	F 0,2 $\mu$ /0,5 $\mu$	185,0
Liberación prolongada dexametasona (O)	MEAD (1048)	36	O 0,7mg	111,6
			O 0,35mg	107,9
	BEVORDEX (88)	12	O 0,7mg	187,0
Somatulina Autogel (S)	Fernández-López E et al. (26)	12	S 90mg/4s	106 (Cirrus) 92,9 (Stratus)

Tabla 47. Resumen del cambio en grosor central retiniano (GCR) en los principales estudios con EMD que describieron los resultados a un año de tratamiento, junto con los obtenidos en esta tesis.

Las OCTs utilizadas para medir el grosor macular varían entre los diferentes estudios, por lo que los valores no son del todo comparables. En este trabajo se trata además de EM persistentes, de largo tiempo de evolución que refractarios a otros tratamientos, lo que podría explicar que la reducción en espesor central retiniano sea algo inferior a la de los otros estudios.

La reducción del EM en este trabajo se produjo durante los 6 primeros meses, estabilizándose desde entonces, pero llama la atención de que a pesar de ello la AV continuó mejorando hasta el año de tratamiento. Una posible hipótesis que explique la continua mejoría en AV a pesar de la estabilidad del EM podría ser el efecto protector de la apoptosis celular del EPR y el efecto antioxidante de la Somatulina observado en el estudio experimental sea capaz de producir mejorías a nivel celular y funcional no detectables mediante la OCT.

### 2.1.3 CAMBIOS EN EL ELECTORRETINOGRAMA

El ERG se ha utilizado en el campo de la RD para valorar los cambios funcionales en estadios tempranos, predecir o valorar cambios con su progresión y monitorizar los efectos de los diferentes tratamientos (Tzekov y Arden, 1999). Varias publicaciones describen como las amplitudes de la onda P50 en el ERG-Pattern y las amplitudes en las respuestas centrales en el ERG multifocal aumentan después de tratar el EMD con ranibizumab (Comyn et al., 2014), bevacizumab (Ozkiriş, 2010) o láser (Lövestam-Adrian y Holm, 2010), aunque faltan estudios prospectivos con mayor número de pacientes y tiempo de seguimiento que confirmen estos resultados.

En este trabajo el tratamiento con Somatulina no ha producido cambios significativos en el ERG-Pattern o Multifocal. Sin embargo, se ha observado una débil tendencia al aumento de amplitud en los anillos 2 y 3 (anillos centrales) del ERG multifocal con el tratamiento. La mejoría del EM con la Somatulina podría explicar esta tendencia a la mejoría de la función macular en los anillos centrales,

mejorando la función visual central con el tratamiento. Un aumento en el número de la muestra podría cambiar la significancia estadística de este resultado. Por otro lado, puesto que los cambios en el EM se localizan en la zona central macular, puede que sean insuficientes para que haya un cambio detectable en el ERG-Pattern que mide la función macular en un área más amplia de la retina, explicando la ausencia de cambios en este test.

#### 2.1.4 EFECTIVIDAD LA SOMATULINA AUTOGEL: A PROPÓSITO DE UN CASO

Entre los pacientes incluidos en esta tesis, merece destacar uno en concreto, en el que no sólo mejoró la AV y el EMD, sino que además disminuyeron de forma significativa los exudados retinianos. El paciente presentaba antes de iniciar el tratamiento AV de 19 letras en el ojo derecho y 10 letras en el ojo izquierdo y un espesor central retiniano de 670  $\mu\text{m}$  y 887  $\mu\text{m}$  respectivamente. Al finalizar los 12 meses de tratamiento la visión mejoró a 37 letras en el ojo derecho y 21 letras en el izquierdo y el edema macular disminuyó alcanzando 316  $\mu\text{m}$  y 251  $\mu\text{m}$  respectivamente. A continuación se muestran las imágenes de OCT Cirrus y fotografías de la retina antes y después del tratamiento.

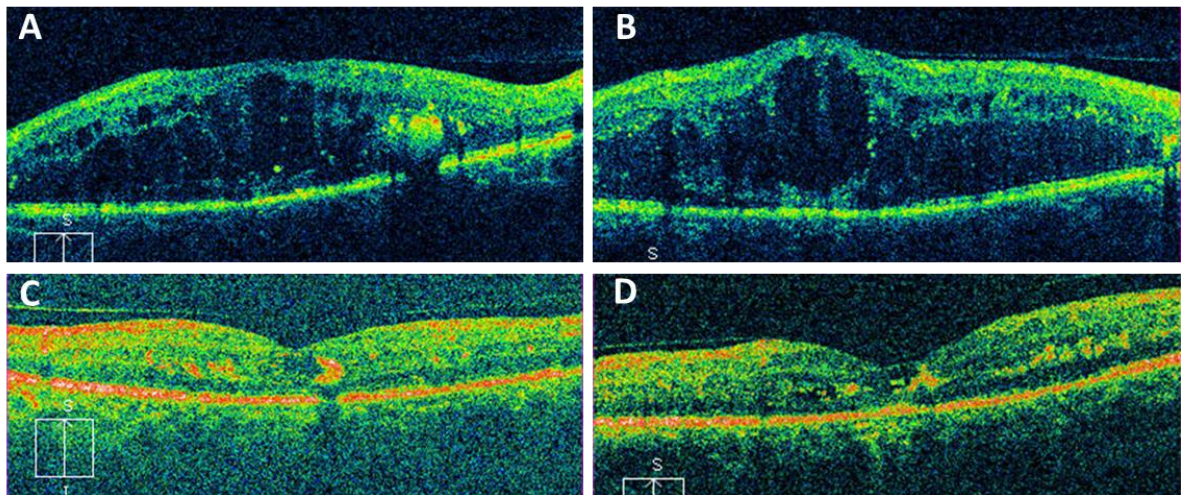


Figura 71. (A-B) Imágenes de OCT Cirrus en la primera visita antes de iniciar el tratamiento con 670  $\mu\text{m}$  de espesor central en el ojo derecho (A) y 887  $\mu\text{m}$  en el izquierdo (B). (C-D) Oct de ambos ojos después de 12 meses de tratamiento, pudiendo observarse una reducción significativa en el EM alcanzando 316  $\mu\text{m}$  en el ojo derecho (C) y 251  $\mu\text{m}$  en el izquierdo.

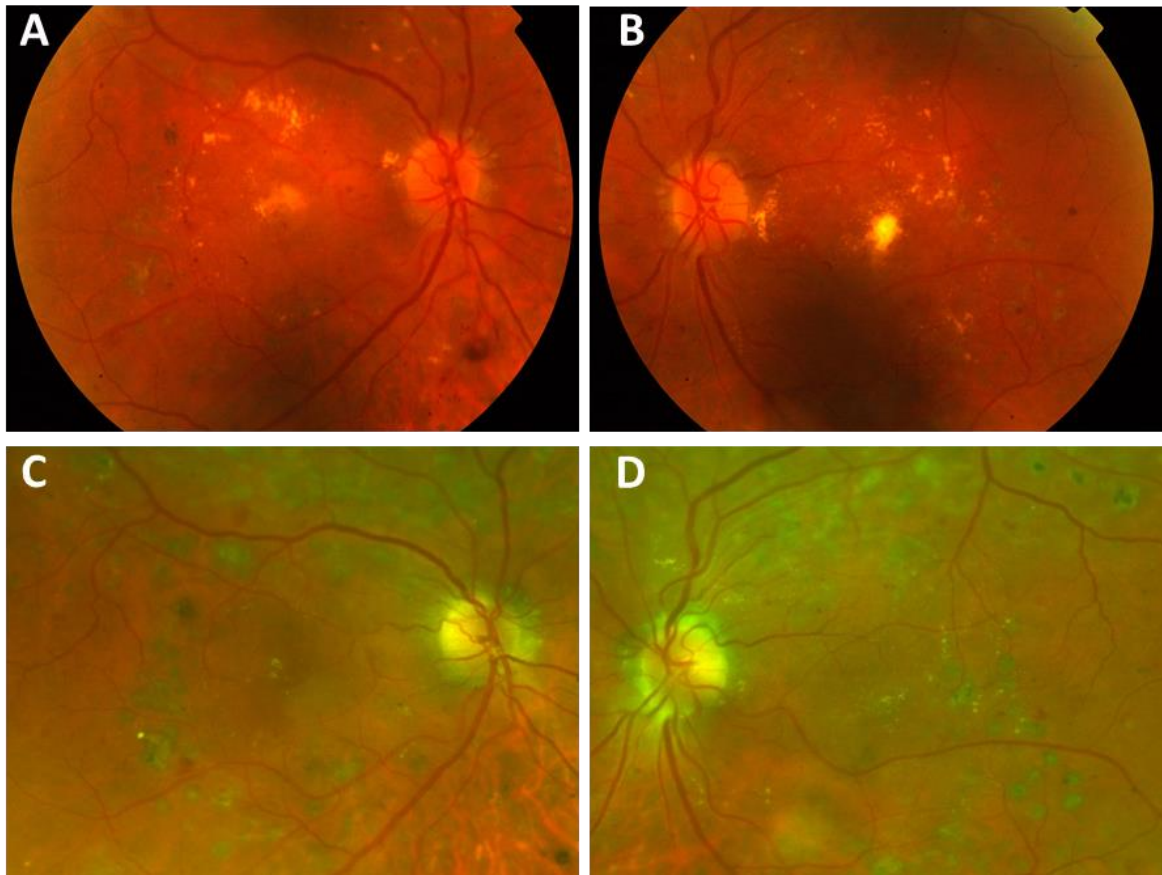


Figura 72. (A-B) Fotografías retinianas antes de iniciar el tratamiento con Somatulina, observándose importantes exudados retinianos en ambos ojos. (C-D) Imágenes retinianas después del tratamiento, donde puede verse como se han reabsorbido la mayoría de exudados.

#### 2.1.5 CAMBIOS EN LA TENSIÓN ARTERIAL Y PARÁMETROS ANALÍTICOS

En cuanto a los cambios en la tensión arterial y parámetros analíticos, en este trabajo hemos observado un descenso estadísticamente significativo en el colesterol total, triglicéridos y proteinuria después del año de tratamiento con Somatulina. Por otro lado, aunque sin alcanzar la significancia estadística hemos observado también una tendencia a la disminución en la tensión arterial diastólica.

Los niveles de lípidos séricos se han relacionado en múltiples trabajos con la severidad de la RD, el EMD y en concreto con la presencia de exudados duros retinianos (Chew et al., 1996; B. E. Klein et al., 1991). Se han publicado casos clínicos en los que se ha observado la regresión de los exudados al disminuir los lípidos séricos (Cusick et al., 2003) y ello ha llevado también a que se haya propuesto el tratamiento adyuvante con hipolipemiantes como la atorvastatina para reducirlos (Gupta et al., 2004). Recientemente Sasaki M y colaboradores han estudiado el tamaño y localización de los exudados duros y su asociación con los lípidos en sangre (Sasaki et al., 2013). Los niveles de colesterol se asociaban con el tamaño del área de exudados: por cada aumento de 1 mM/L en colesterol total el área de exudados aumentaba 0,097 mm<sup>2</sup> y para el mismo aumento de LDL-colesterol 0,105 mm<sup>2</sup>. Además, cada aumento

en 1 mM/L de triglicéridos multiplicaba el riesgo por 2,1 de tener exudados duros en la zona central de la mácula (P= 0,023). Por otro lado la presencia de proteinuria (Roy y Klein, 2001) y la tensión arterial diastólica elevada (Klein BE et al., 1991) se han asociado de forma independiente con la severidad de los exudados retinianos duros.

La disminución por tanto de estos parámetros con la Somatulina en este trabajo, podría explicar la reabsorción de los exudados duros en el paciente presentado previamente, pudiendo ser un buen tratamiento para los EM con presencia de exudados retinianos que son más difíciles de tratar dando lugar a mayores pérdidas de visión.

Por otro lado, aunque sin resultados estadísticamente significativos hemos observado una tendencia al aumento de la hemoglobina glicosilada con el tratamiento, sin encontrar cambios significativos o tendencias en la glucemia basal. La Somatulina como otros análogos de la SST inhibe la secreción de insulina y glucagón, pudiendo ser responsable de los cambios en el control glucémico de estos pacientes. Otros trabajos en pacientes con acromegalia tratados con Somatulina no han encontrado aumento de la hemoglobina glicosilada con la medicación (Giustina et al., 2009; Yetkin et al., 2007). Sin embargo, sería importante monitorizar los niveles de glucosa en sangre de forma más estricta cuando se inicie el tratamiento y ajustar los antidiabéticos orales o insulina si fuera necesario.

#### **2.1.6 ANÁLISIS DE LOS EFECTOS ADVERSOS Y ABANDONOS**

Aunque actualmente la Somatulina no está aprobada para el tratamiento de la RD y se ha usado como tratamiento compasivo, existe abundante experiencia clínica con ella al formar parte del tratamiento de la acromegalia desde hace años. Los estudios en el contexto de la acromegalia han descrito una buena tolerancia de la medicación siendo los efectos adversos más frecuentes síntomas gastrointestinales y molestias, eritema o induración en la zona de la inyección. La mayoría de estos efectos adversos son además leves o moderados y transitorios (Burness et al., 2014; Fleseriu, 2011).

En este trabajo hemos podido observar la misma tendencia en nuestros pacientes. Los efectos adversos más frecuentes fueron la diarrea y meteorismo, presentes en el 76,92% y 69,23% respectivamente el primer mes de tratamiento. De los cinco pacientes que abandonaron el estudio, dos de ellos lo hicieron por los efectos adversos gastrointestinales. Los efectos adversos locales en la zona de la inyección fueron mucho menores, presentándose sólo en cuatro de los trece pacientes (30,77%) en alguno de los tres primeros meses, siendo la induración en la zona de la inyección el más habitual. A partir de la segunda dosis de Somatulina los efectos adversos locales y sistémicos fueron disminuyendo de forma progresiva. A partir del sexto mes no se volvió a registrar ningún efecto adverso local, ocho pacientes (61,54%) a los seis meses y diez de los trece pacientes (76,92%) a los doce meses no tenía ningún efecto adverso sistémico. Por lo tanto podemos decir que en este estudio la Somatulina se mostró segura, sin existir ningún efecto adverso grave y fue generalmente bien tolerada por la mayoría de los pacientes.

Tres pacientes de los 18 inicialmente incluidos abandonaron el estudio debido a otras patologías sistémicas concomitantes: una fractura de miembro inferior, una pericarditis y una intervención de bypass cardíaco. Estudios han mostrado que los diabéticos presentan un riesgo entre 2 y 4 veces mayor de enfermedad cardíaca o infartos (Do et al., 2012; Gregg et al., 2007), por lo que los dos últimos eventos cardiovasculares podrían atribuirse a la condición médica y comorbilidades cardiovasculares de los pacientes diabéticos.

### 2.1.7 POSIBLES APLICACIONES CLÍNICAS DENTRO DEL MARCO ACTUAL DE TRATAMIENTO

Durante el transcurso de esta tesis la introducción de los anti-VEGF y los dispositivos de liberación prolongada de corticoides en los protocolos de tratamiento de la RD y EMD han reducido considerablemente el número de EM refractarios. Además, los últimos resultados publicados con aflibercept recientemente son muy prometedores (Korobelnik et al., 2014). La Somatulina podría aplicarse en los pocos pacientes no respondedores a láser, anti-VEGF o corticoides, pero además podría suponer una buena alternativa a los dispositivos de liberación prolongada de corticoides en pacientes fájicos o pacientes con glaucoma, evitando los efectos adversos oculares de los corticoides.

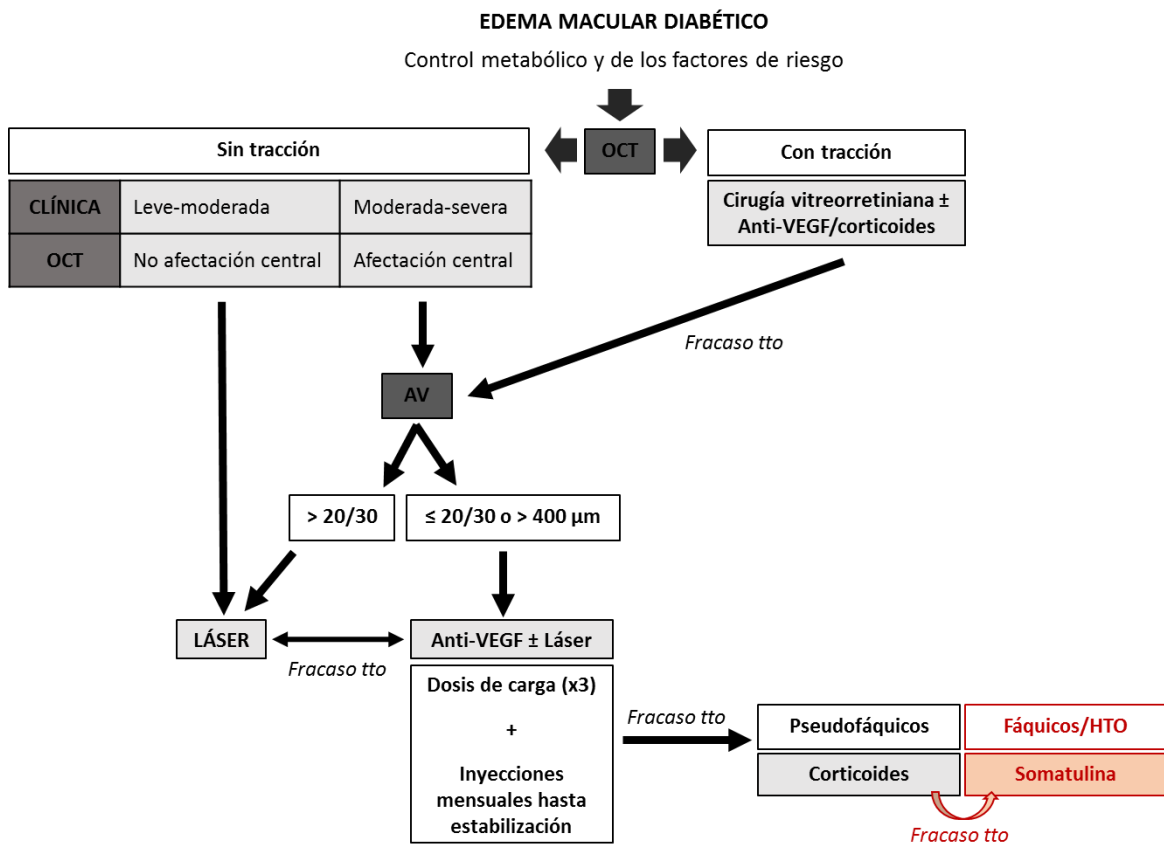


Figura 73. Esquema que resume las guías de tratamiento actuales del EMD junto a las posibles futuras indicaciones de la Somatulina.

## **3 LIMITACIONES DEL TRABAJO**

### **3.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL**

El estudio experimental tiene limitaciones derivadas del número de marcadores estudiados. Para entender mejor el efecto de la S sobre la apoptosis celular y el estrés oxidativo sería necesario estudiar otros marcadores de apoptosis y estrés oxidativo además de la caspasa-3 y JNK. Nuestro trabajo proporciona sin embargo resultados preliminares que podrían servir para generar una hipótesis de trabajo para futuros estudios con más marcadores.

### **3.2 LIMITACIONES DEL ESTUDIO CLÍNICO**

Las principales limitaciones del estudio incluyen sobretodo el pequeño tamaño de la muestra y la ausencia de grupo control. Por lo tanto, aunque el estudio apunta a unos buenos resultados visuales y anatómicos con Somatulina, habría que realizar un estudio de mayor escala, con un grupo control, aleatorizado y con un mayor tiempo de seguimiento para valorar con un mayor nivel de evidencia el efecto de la Somatulina sobre el EM refractario.

## **4 FUTURAS LINEAS DE TRABAJO**

Según los hallazgos de nuestro trabajo y lo publicado en la literatura científica, los análogos de la SST podrían utilizarse tanto en fases más avanzadas de la RD para tratar el EMD y RDP, como en los estadios iniciales o preclínicos para prevenir el proceso neurodegenerativo. De forma preventiva la administración sistémica de análogos de SST, utilizada en la mayoría de los estudios no sería una buena opción dados los efectos secundarios. Además la BHR podría ser un factor limitante de la administración sistémica de fármacos que tengan como diana la retina. Por ello deberían evaluarse otras vías de administración como tópica o intravítrea que fueran más cómodas para el paciente o disminuyeran los efectos secundarios sistémicos. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico randomizado controlado de fase II-III (EUROCONDOR-278040) dentro de un proyecto europeo del programa marco, para evaluar la eficacia de la SST tópica para prevenir o detener la progresión de la RD ([http://ec.europa.eu/research/health/medical-research/diabetes-and-obesity/projects/eurocondor\\_en.html](http://ec.europa.eu/research/health/medical-research/diabetes-and-obesity/projects/eurocondor_en.html)).

Por otro lado, en cuanto al tratamiento del EMD, futuros estudios podrían analizar si se consiguen los mismos resultados con diferentes dosis e intervalos de tratamiento para intentar disminuir el número de inyecciones o minimizar los efectos adversos. Del mismo modo podrían estudiarse otras vías de administración así como su efecto sobre el EMD. Por último, sería interesante aplicar modelos de análisis que contemplen la posible interrelación entre los ojos de un mismo paciente con el tratamiento.

## CONCLUSIONES

1. El tratamiento con somatulina de cultivos celulares diabéticos de células ARPE-19 reduce de forma significativa la expresión del VEGF de  $94,14 \pm 6,10$  a  $80,59 \pm 2,98$ , explicando uno de los mecanismos antiangiogénicos de los análogos de la somatulina.
2. El tratamiento con somatulina de cultivos celulares diabéticos de células ARPE-19 disminuye de forma significativa la expresión de caspasa-3 reduciéndose de  $77,15 \pm 12,48$  a  $47,39 \pm 11,91$ . Por lo que podemos afirmar que la somatulina ejerce un papel protector frente a la apoptosis de las células ARPE-19 diabéticas, mediada por la vía de la caspasa-3.
3. El tratamiento con somatulina de cultivos celulares diabéticos de células ARPE-19 disminuye de forma significativa la expresión del JNK reduciéndose de  $55,49 \pm 4,81$  a  $35,76 \pm 6,17$ , por lo que podemos afirmar que la apoptosis celular causada por estrés oxidativo medida a través de la vía de JNK, disminuye de forma significativa con la administración de S.
4. Al correlacionar los niveles de los diferentes marcadores estudiados en los cultivos diabéticos y controles se observó una relación directa significativa entre la reducción de los niveles de JNK y la reducción de los niveles de VEGF ( $r=0,590$ ), por lo que la disminución de VEGF por la S podría explicarse por el descenso de JNK. También se encontraron relaciones positivas significativas entre los niveles de VEGF y caspasa-3 ( $r=0,558$ ) y entre caspasa-3 y JNK ( $r=0,544$ ).
5. El tratamiento con S en pacientes con EMD persistente se considera efectivo en cuanto a resultados visuales y anatómicos, siendo significativas la ganancia en AV y reducción del espesor macular, volumen macular y volumen foveal a los doce meses de tratamiento. La S no ha producido cambios significativos en el ERG aunque hay una tendencia a la mejoría de los anillos centrales.
6. El tratamiento con S ha producido una reducción significativa del colesterol total, triglicéridos y proteinuria.
7. La percepción global del paciente respecto a su función visual no ha cambiado de forma significativa tras el tratamiento, pero sí que lo ha hecho para determinadas tareas.



## BIBLIOGRAFÍA

Ababneh OH, Yousef YA, Gharaibeh AM, Abu Ameerh MA, Abu-Yaghi NE, Al Bdour MD. Intravitreal bevacizumab in the treatment of diabetic ocular neovascularization. *Retina*. 2013;33(4):748-55.

Abrishami M, Moosavi MN, Shoeibi N, Hosseinpour SS. Intravitreal tissue plasminogen activator to treat refractory diabetic macular edema by induction of posterior vitreous detachment. *Retina*. 2011;31(10):2065-70.

Abu-El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, Al-Jadaan IA, Geboes K. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(8):2760-6.

Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1994;118(4):445-50.

Ahmadiéh H, Shoeibi N, Entezari M, Monshizadeh R. Intravitreal bevacizumab for prevention of early postvitrectomy hemorrhage in diabetic patients: a randomized clinical trial. *Ophthalmology*. 2009;116(10):1943-8.

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*. 1994;331(22):1480-7.

Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(12):1538-44.

Aiello LP. The potential role of PKC beta in diabetic retinopathy and macular edema. *Surv Ophthalmol*. 2002;47 Suppl 2:S263-9.

Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem*. 2005;16(12):705-13.

Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*. 1997;64(1):33-42.

Al-Shabrawey M, Bartoli M, El-Remessy AB, Platt DH, Matragoon S, Behzadian MA, et al. Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy. *Am J Pathol*. 2005;167(2):599-607.

American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2006; 29:43-48.

Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Puklin JE, Abrams GW. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(1):36-47.

Arnal E, Miranda M, Johnsen-Soriano S, Alvarez-Nölting R, Díaz-Llopis M, Araiz J, et al. Beneficial effect of docosahexanoic acid and lutein on retinal structural, metabolic, and functional abnormalities in diabetic rats. *Curr Eye Res*. 2009;34(11):928-38.

Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995;92(9 Suppl):II365-71.

Ashton N. The pathology of retinal microaneurysms. *Acta XVI Concilium Ophthalmologicum* 1950. p. 411-21.

Association AD. Standard of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26 (suppl 1):33-50.

Augustin AJ, Dick HB, Grus F. Oxidative metabolites and VEGF in proliferative diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 2000;139.

Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 2006;113(10):1695.e1-15.

Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Induction of vascular endothelial growth factor by 4-hydroxynonenal and its prevention by glutathione precursors in retinal pigment epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2002; 449(3):213-20.

Baldysiak-Figiel A, Lang GK, Kampmeier J, Lang GE. Octreotide prevents growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia. *J Endocrinol*. 2004;180(3):417-24.

Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(2):1156-63.

Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(2):283-90.

Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(4):405-12.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1620-4.

Bevan JS, Atkin SL, Atkinson AB, Bouloux PM, Hanna F, Harris PE, et al. Primary medical therapy for acromegaly: an open, prospective, multicenter study of the effects of subcutaneous and intramuscular slow-release octreotide on growth hormone, insulin-like growth factor-I, and tumor size. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(10):4554-63.

Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Surv Ophthalmol*. 2009;54(1):1-32.

Bloomgarden ZT. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2008;31(5):1080-3.

Boehm BO, Lang GK, Jehle PM, Feldman B, Lang GE. Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res*. 2001;33(5):300-6.

Boehm BO. Use of long-acting somatostatin analogue treatment in diabetic retinopathy. *Dev Ophthalmol.* 2007;39:111-21.

Boulton M, Gregor Z, McLeod D, Charteris D, Jarvis-Evans J, Moriarty P, et al. Intravitreal growth factors in proliferative diabetic retinopathy: correlation with neovascular activity and glycaemic management. *Br J Ophthalmol.* 1997;81(3):228-33.

Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaissier E, Copeland J, McDonagh P, et al. The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;26(5):932-8.

Boyer DS, Yoon YH, Belfort R, Bandello F, Maturi RK, Augustin AJ, et al. Three-year, randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2014;121(10):1904-14.

Bressler NM, Varma R, Suñer IJ, Dolan CM, Ward J, Ehrlich JS, et al. Vision-Related Function after Ranibizumab Treatment for Diabetic Macular Edema: Results from RIDE and RISE. *Ophthalmology.* 2014.

Brown DM, Nguyen QD, Marcus DM, Boyer DS, Patel S, Feiner L, et al. Long-term outcomes of ranibizumab therapy for diabetic macular edema: the 36-month results from two phase III trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology.* 2013;120(10):2013-22.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-20.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54:1615-25.

Burgos R, Mateo C, Cantón A, Hernández C, Mesa J, Simó R. Vitreous levels of IGF-I, IGF binding protein 1, and IGF binding protein 3 in proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care.* 2000;23(1):80-3.

Burness CB, Dhillon S, Keam SJ. Lanreotide autogel(®): a review of its use in the treatment of patients with acromegaly. *Drugs.* 2014;74(14):1673-91.

Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP, Aiello LM, Schlossman DK, Feener EP, et al. High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 1999;22(8):1245-51.

Cabrera F, Armadá F. [Randomized clinical trials in diabetic macular edema]. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2012;87 Suppl 1:27-37.

Campochiaro PA, Brown DM, Pearson A, Chen S, Boyer D, Ruiz-Moreno J, et al. Sustained delivery fluocinolone acetonide vitreous inserts provide benefit for at least 3 years in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2012;119(10):2125-32.

Campochiaro PA, Brown DM, Pearson A, Ciulla T, Boyer D, Holz FG, et al. Long-term benefit of sustained-delivery fluocinolone acetonide vitreous inserts for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2011;118(4):626-35.e2.

Cao G, Chen M, Song Q, Liu Y, Xie L, Han Y, et al. EGCG protects against UVB-induced apoptosis via oxidative stress and the JNK1/c-Jun pathway in ARPE19 cells. *Mol Med Rep*. 2012;5(1):54-9.

Carrasco E, Hernández C, Miralles A, Huguet P, Farrés J, Simó R. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes Care*. 2007;30(11):2902-8.

Centers for disease control and prevention. Blindness caused by diabetes. Massachusetts 1987-1996. p. 937-41.

Cervia D, Casini G, Bagnoli P. Physiology and pathology of somatostatin in the mammalian retina: a current view. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286(1-2):112-22.

Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, Wordsworth S, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology*. 2012;119(7):1399-411.

Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1985;17(2):145-52.

Chan CK, Lai TY, Mohamed S, Lee VY, Liu DT, Li CL, et al. Combined high-dose sub-tenon triamcinolone, intravitreal bevacizumab, and laser photocoagulation for refractory diabetic macular edema: a pilot study. *Retina*. 2012;32(4):672-8.

Cheema RA, Mushtaq J, Al-Khars W, Al-Askar E, Cheema MA. Role of intravitreal bevacizumab (Avastin) injected at the end of diabetic vitrectomy in preventing postoperative recurrent vitreous hemorrhage. *Retina*. 2010;30(10):1646-50.

Chew EY, Klein ML, Ferris FL, Remaley NA, Murphy RP, Chantry K, et al. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol*. 1996;114(9):1079-84.

Cho WB, Oh SB, Moon JW, Kim HC. Panretinal photocoagulation combined with intravitreal bevacizumab in high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Retina*. 2009;29(4):516-22.

Cintra LP, Costa RA, Ribeiro JA, Calucci D, Scott IU, Messias A, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study): 1-year results. *Retina*. 2013;33(6):1109-16.

Comyn O, Sivaprasad S, Peto T, Neveu MM, Holder GE, Xing W, et al. A randomized trial to assess functional and structural effects of ranibizumab versus laser in diabetic macular edema (the LUCIDATE study). *Am J Ophthalmol*. 2014;157(5):960-70.

Cunha-Vaz J, Ashton P, Iezzi R, Campochiaro P, Dugel PU, Holz FG, et al. Sustained delivery fluocinolone acetonide vitreous implants: long-term benefit in patients with chronic diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2014;121(10):1892-903.

Cusick M, Chew EY, Chan CC, Kruth HS, Murphy RP, Ferris FL. Histopathology and regression of retinal hard exudates in diabetic retinopathy after reduction of elevated serum lipid levels. *Ophthalmology*. 2003;110(11):2126-33.

Dal Monte M, Ristori C, Cammalleri M, Bagnoli P. Effects of somatostatin analogues on retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: involvement of the somatostatin receptor subtype 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3596-606.

Danesi R, Agen C, Benelli U, Paolo AD, Nardini D, Bocci G, et al. Inhibition of experimental angiogenesis by the somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201-995). *Clin Cancer Res.* 1997;3(2):265-72.

Danesi R, Del Tacca M. The effects of the somatostatin analog octreotide on angiogenesis in vitro. *Metabolism.* 1996;45(8 Suppl 1):49-50.

Danis RP, Bingaman DP. Insulin-like growth factor-1 retinal microangiopathy in the pig eye. *Ophthalmology.* 1997;104(10):1661-9.

Dasgupta P. Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol Ther.* 2004;102(1):61-85.

Davis MI, Wilson SH, Grant MB. The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors. *Horm Metab Res.* 2001;33(5):295-9.

Decanini A, Karunadharm PR, Nordgaard CL, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA. Human retinal pigment epithelium proteome changes in early diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(6):1051-61.

Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene.* 2003;22(37):5885-96.

Diabetic Retinopathy Research Study Group. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. Report Number 7. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;21:210-26.

Dills DG, Moss SE, Klein R, Klein BE. Association of elevated IGF-I levels with increased retinopathy in late-onset diabetes. *Diabetes.* 1991;40(12):1725-30.

Do DV, Nguyen QD, Boyer D, Schmidt-Erfurth U, Brown DM, Vitti R, et al. One-year outcomes of the da Vinci Study of VEGF Trap-Eye in eyes with diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2012;119(8):1658-65.

Do DV, Nguyen QD, Khwaja AA, Channa R, Sepah YJ, Sophie R, et al. Ranibizumab for edema of the macula in diabetes study: 3-year outcomes and the need for prolonged frequent treatment. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(2):139-45.

Do DV, Schmidt-Erfurth U, Gonzalez VH, Gordon CM, Tolentino M, Berliner AJ, et al. The DA VINCI Study: phase 2 primary results of VEGF Trap-Eye in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2011;118(9):1819-26.

Donaldson M, Dodson PM. Medical treatment of diabetic retinopathy. *Eye (Lond).* 2003;17(5):550-62.

Doonan F, Wallace DM, O'Driscoll C, Cotter TG. Rosiglitazone acts as a neuroprotectant in retinal cells via up-regulation of sestrin-1 and SOD-2. *J Neurochem.* 2009;109(2):631-43.

Du H, Sun X, Guma M, Luo J, Ouyang H, Zhang X, et al. JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(6):2377-82.

Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*. 1996;62(2):155-69.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs - an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS Report Number 10. *Ophthalmology*. 1991;98:786-806.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS Report Number 1. *Arch Ophthalmol*. 1985;103:1796-806.

Elman MJ, Aiello LP, Beck RW, Bressler NM, Bressler SB, Edwards AR, et al. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1064-77.e35.

Elman MJ, Bressler NM, Qin H, Beck RW, Ferris FL, Friedman SM, et al. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2011;118(4):609-14.

Elman MJ, Qin H, Aiello LP, Beck RW, Bressler NM, Ferris FL, et al. Intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema with prompt versus deferred laser treatment: three-year randomized trial results. *Ophthalmology*. 2012;119(11):2312-8.

Erdol H, Turk A, Akyol N, Imamoglu HI. The results of intravitreal bevacizumab injections for persistent neovascularizations in proliferative diabetic retinopathy after photocoagulation therapy. *Retina*. 2010;30(4):570-7.

Ernst BJ, García-Aguirre G, Oliver SC, Olson JL, Mandava N, Quiroz-Mercado H. Intravitreal bevacizumab versus panretinal photocoagulation for treatment-naïve proliferative and severe nonproliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(7):e573-4.

Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, et al. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris*. 2000;94(3-4):205-10.

Ferraz DA, Vasquez LM, Preti RC, Motta A, Sophie R, Bittencourt MG, et al. A randomized controlled trial of panretinal photocoagulation with and without intravitreal ranibizumab in treatment-naive eyes with non-high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Retina*. 2014.

Fischer S, Renz D, Schaper W, Karliczek GF. In vitro effects of dexamethasone on hypoxia-induced hyperpermeability and expression of vascular endothelial growth factor. *Eur J Pharmacol*. 2001;411(3):231-43.

Fleseriu M. Clinical efficacy and safety results for dose escalation of somatostatin receptor ligands in patients with acromegaly: a literature review. *Pituitary*. 2011;14(2):184-93.

Flynn HW, Chew EY, Simons BD, Barton FB, Remaley NA, Ferris FL. Pars plana vitrectomy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study. ETDRS report number 17. The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1992;99(9):1351-7.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(12):4533-7.

Gabay KH. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Med*. 1975;26:521-36.

Gabig TG, Babior BM. The O<sub>2</sub>(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem*. 1979;254(18):9070-4.

García de la Torre N, Wass JA, Turner HE. Antiangiogenic effects of somatostatin analogues. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(4):425-41.

Geiger RC, Waters CM, Kamp DW, Glucksberg MR. KGF prevents oxygen-mediated damage in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(9):3435-42.

Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*. 2004;118(6):781-94.

Gerich JE, Lorenzi M, Bier DM, Tsalikian E, Schneider V, Karam JH, et al. Effects of physiologic levels of glucagon and growth hormone on human carbohydrate and lipid metabolism. Studies involving administration of exogenous hormone during suppression of endogenous hormone secretion with somatostatin. *J Clin Invest*. 1976;57(4):875-84.

Gerich JE, Lorenzi M, Schneider V, Karam JH, Rivier J, Guillemin R, et al. Effects of somatostatin on plasma glucose and glucagon levels in human diabetes mellitus. Pathophysiologic and therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1974;291(11):544-7.

Gerich JE, Schultz TA, Lewis SB, Karam JH. Clinical evaluation of somatostatin as a potential adjunct to insulin in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1977;13(5):537-44.

Giuliari GP, Guel DA, Cortez MA, Cortez RT. Selective and pan-blockade agents in the anti-angiogenic treatment of proliferative diabetic retinopathy: a literature summary. *Can J Ophthalmol*. 2010;45(5):501-8.

Giuliari GP. Diabetic retinopathy: current and new treatment options. *Curr Diabetes Rev*. 2012;8(1):32-41.

Giustina A, Bonadonna S, Bugari G, Colao A, Cozzi R, Cannavo S, et al. High-dose intramuscular octreotide in patients with acromegaly inadequately controlled on conventional somatostatin analogue therapy: a randomised controlled trial. *Eur J Endocrinol*. 2009;161(2):331-8.

Goldracena MB, Escudero, JM, Arrondo. Prevalencia de la Retinopatía Diabética en una población diabética registrada en atención primaria. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 1998.

Grant M, Russell B, Fitzgerald C, Merimee TJ. Insulin-like growth factors in vitreous. Studies in control and diabetic subjects with neovascularization. *Diabetes*. 1986;35(4):416-20.

Grant MB, Caballero S, Millard WJ. Inhibition of IGF-I and b-FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide: a potential treatment for ocular neovascularization. *Regul Pept*. 1993;48(1-2):267-78.



Grant MB, Guay C, Marsh R. Insulin-like growth factor I stimulates proliferation, migration, and plasminogen activator release by human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res.* 1990;9(4):323-35.

Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Caballero S, Chegini N, et al. Insulin-like growth factor I as an angiogenic agent. In vivo and in vitro studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;692:230-42.

Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Hazariwala KM, Cooper-DeHoff R, Caballero S, et al. The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes Care.* 2000;23(4):504-9.

Gregg EW, Gu Q, Cheng YJ, Narayan KM, Cowie CC. Mortality trends in men and women with diabetes, 1971 to 2000. *Ann Intern Med.* 2007;147(3):149-55.

Guma M, Rius J, Duong-Polk KX, Haddad GG, Lindsey JD, Karin M. Genetic and pharmacological inhibition of JNK ameliorates hypoxia-induced retinopathy through interference with VEGF expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8760-5.

Gupta A, Gupta V, Thapar S, Bhansali A. Lipid-lowering drug atorvastatin as an adjunct in the management of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol.* 2004;137(4):675-82.

Hall R, Besser GM, Schally AV, Coy DH, Evered D, Goldie DJ, et al. Action of growth-hormone-release inhibitory hormone in healthy men and in acromegaly. *Lancet.* 1973;2(7829):581-4.

Haller JA, Bandello F, Belfort R, Blumenkranz MS, Gillies M, Heier J, et al. Randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema due to retinal vein occlusion. *Ophthalmology.* 2010;117(6):1134-46.e3.

Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 1984;1(8391):1396-7.

Han DP, Abrams GW, Aaberg TM. Surgical excision of the attached posterior hyaloid. *Arch Ophthalmol.* 1988;106(7):998-1000.

Hannon JP, Nunn C, Stolz B, Bruns C, Weckbecker G, Lewis I, et al. Drug design at peptide receptors: somatostatin receptor ligands. *J Mol Neurosci.* 2002;18(1-2):15-27.

Hansen AP, Johansen K. Diurnal patterns of blood glucose, serum free fatty acids, insulin, glucagon and growth hormone in normals and juvenile diabetics. *Diabetologia.* 1970;6(1):27-33.

Hernaez-Ortega MC, Soto-Pedre E, Martin JJ. Sandostatin LAR for cystoid diabetic macular edema: a 1-year experience. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004;64(1):71-2.

Hernaez-Ortega MC, Soto-Pedre E, Piniés JA. Lanreotide Autogel for persistent diabetic macular edema. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;80(3):e8-10.

Hernández C, Carrasco E, Casamitjana R, Deulofeu R, García-Arumí J, Simó R. Somatostatin molecular variants in the vitreous fluid: a comparative study between diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects. *Diabetes Care.* 2005;28(8):1941-7.

Hernández C, García-Ramírez M, Corraliza L, Fernández-Carneado J, Farrera-Sinfreu J, Ponsati B, et al. Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes*. 2013;62(7):2569-78.

Higgins RD, Yan Y, Schrier BK. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularization. *Exp Eye Res*. 2002;74(5):553-9.

Ho AC, Scott IU, Kim SJ, Brown GC, Brown MM, Ip MS, et al. Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for diabetic macular edema: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 2012;119(10):2179-88.

Ho TC, Yang YC, Cheng HC, Wu AC, Chen SL, Chen HK, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases is essential for hydrogen peroxide -induced apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *Apoptosis*. 2006;11(11):1899-908.

Hogewind BF, Pieters G, Hoyng CB. Octreotide acetate in dominant cystoid macular dystrophy. *Eur J Ophthalmol*. 2008;18(1):99-103.

Holly JM, Amiel SA, Sandhu RR, Rees LH, Wass JA. The role of growth hormone in diabetes mellitus. *J Endocrinol*. 1988;118(3):353-64.

Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(3):86-8.

Huang YH, Yeh PT, Chen MS, Yang CH, Yang CM. Intravitreal bevacizumab and panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy associated with vitreous hemorrhage. *Retina*. 2009;29(8):1134-40.

Hyer SL, Sharp PS, Brooks RA, Burrin JM, Kohner EM. A two-year follow-up study of serum insulinlike growth factor-I in diabetics with retinopathy. *Metabolism*. 1989;38(6):586-9.

Iliev ME, Domig D, Wolf-Schnurrbursch U, Wolf S, Sarra GM. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of neovascular glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2006;142(6):1054-6.

Ip MS, Domalpally A, Hopkins JJ, Wong P, Ehrlich JS. Long-term effects of ranibizumab on diabetic retinopathy severity and progression. *Arch Ophthalmol*. 2012;130(9):1145-52.

Johnsen-Soriano S, Garcia-Pous M, Arnal E, Sancho-Tello M, Garcia-Delpech S, Miranda M, et al. Early lipoid acid intake protects retina of diabetic mice. *Free Radic Res*. 2008;42(7):613-7.

Jonas JB, Libondi T, von Baltz S, Vossmerbaeumer U. Intravitreal bevacizumab for vitreous haemorrhage. *Acta Ophthalmol*. 2008;86(5):585-6.

Jorge R, Costa RA, Calucci D, Cintra LP, Scott IU. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). *Retina*. 2006;26(9):1006-13.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996;15(7):1751.

- Kafkala C, Choi JY, Choopong P, Foster CS. Octreotide as a treatment for uveitic cystoid macular edema. *Arch Ophthalmol*. 2006;124(9):1353-5.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005;120(5):649-61.
- Kás J, Blatná J. Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol Med (Praha)*. 1986;32(1-2):81-92.
- Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (Lond)*. 1995;9 ( Pt 6):763-71.
- Kern TS, Tang J, Mizutani M, Kowluru RA, Nagaraj RH, Romeo G, et al. Response of capillary cell death to aminoguanidine predicts the development of retinopathy: comparison of diabetes and galactosemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(12):3972-8.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
- Kim YT, Kang SW, Kim SJ, Kim SM, Chung SE. Combination of vitrectomy, IVTA, and laser photocoagulation for diabetic macular edema unresponsive to prior treatments; 3-year results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012;250(5):679-84.
- Kimoto K, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H. p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF- $\beta$  2 in human retinal pigment epithelial cells ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(7):2431-7.
- Kinnunen K, Ylä-Herttua S. Vascular endothelial growth factors in retinal and choroidal neovascular diseases. *Ann Med*. 2012;44(1):1-17.
- Klein BE, Moss SE, Klein R, Surawicz TS. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. *Ophthalmology*. 1991;98(8):1261-5.
- Klein BE, Moss SE, Klein R. Effect of pregnancy on progression of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1990;13(1):34-40.
- Klein R KB, Moss SE et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmology*. 1984;102: 520-6.
- Klein R KB, Moss SE et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol*. 1984;102:527-32.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology*. 1995;102(1):7-16.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 1984;91(12):1464-74.

- Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care*. 1995;18(2):258-68.
- Klisovic DD, O'Doriso MS, Katz SE, Sall JW, Balster D, O'Doriso TM, et al. Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(10):2193-201.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002;30(6):620-50.
- Kohner EM, Hamilton AM, Joplin GF, Fraser TR. Florid diabetic retinopathy and its response to treatment by photocoagulation or pituitary ablation. *Diabetes*. 1976;25(2):104-10.
- Korobelnik JF, Do DV, Schmidt-Erfurth U, Boyer DS, Holz FG, Heier JS, et al. Intravitreal Aflibercept for Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology*. 2014.
- Kouvidi E, Papadopoulou-Daifoti Z, Thermos K. Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neurosci Lett*. 2006;391(3):82-6.
- Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:43603.
- Kowluru RA, Koppolu P. Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res*. 2002;36(9):993-9.
- Kowluru RA, Odenbach S. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes*. 2004;53(12):3233-8.
- Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(11-12):1581-87.
- Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes*. 2003;52(3):818-23.
- Krassas GE, Tzotzas T, Papazisis K, Pazaitou-Panayiotou K, Boboridis K. The efficacy of somatostatin analogues in the treatment of diabetic retinopathy and thyroid eye disease. *Clin Ophthalmol*. 2007;1(3):209-15.
- Kristal BS, Koopmans SJ, Jackson CT, Ikeno Y, Park BJ, Yu BP. Oxidant-mediated repression of mitochondrial transcription in diabetic rats. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(5):813-22.
- Kuijpers RW, Baarsma S, van Hagen PM. Treatment of cystoid macular edema with octreotide. *N Engl J Med*. 1998;338(9):624-6.
- Kuisaki M, Bursell SE, Clemont AC, Ishii H et al. Vitamin E prevent diabetes-induced abnormal retinal blood flow via diacylglycerol-protein kinase C pathway. *Am J Physiol*. 1995;269:E239-E46.
- Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. Prevention of diabetes-induced abnormal retinal blood flow by treatment with d-alpha-tocopherol. *Biofactors*. 1998;7(1-2):55-67.

Kvols LK, Woltering EA. Role of somatostatin analogs in the clinical management of non-neuroendocrine solid tumors. *Anticancer Drugs*. 2006;17(6):601-8.

Lafuente M. *Retinopatía Diabética*. 2005.

Lafuente M. *Retinopatía diabética. Enfoque endocrinológico y sistémico. Fisiopatología. Retinopatía Diabética. Tratado médico-quirúrgico*. Mac Line S.L; 2006.

Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med*. 1996;334(4):246-54.

Lambooy AC, Kuijpers RW, van Lichtenauer-Kaligis EG, Kliffen M, Baarsma GS, van Hagen PM, et al. Somatostatin receptor 2A expression in choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(8):2329-35.

Lang GE, Berta A, Eldem BM, Simader C, Sharp D, Holz FG, et al. Two-year safety and efficacy of ranibizumab 0.5 mg in diabetic macular edema: interim analysis of the RESTORE extension study. *Ophthalmology*. 2013;120(10):2004-12.

Ławnicka H, Pisarek H, Kunert-Radek J, Pawlikowski M. Effects of somatostatin on vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from non-functioning pituitary tumoral cells incubated in vitro. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29(1):113-6.

Lawnicka H, Stepień H, Wyczółkowska J, Kolago B, Kunert-Radek J, Komorowski J. Effect of somatostatin and octreotide on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion from murine endothelial cell line (HECa10) culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268(2):567-71.

Lazic R, Lukic M, Boras I, Draca N, Vlasic M, Gabric N, et al. Treatment of anti-vascular endothelial growth factor-resistant diabetic macular edema with dexamethasone intravitreal implant. *Retina*. 2014;34(4):719-24.

Lee HK, Suh KI, Koh CS, Min HK, Lee JH, Chung H. Effect of SMS 201-995 in rapidly progressive diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1988;11(5):441-3.

Li T, Dai W, Lu L. Ultraviolet-induced junD activation and apoptosis in myeloblastic leukemia ML-1 cells. *J Biol Chem*. 2002;277(36):32668-76.

Li W, Sinclair SH, Xu GT. Effects of intravitreal erythropoietin therapy for patients with chronic and progressive diabetic macular edema. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2010;41(1):18-25.

Lopes de Faria JM, Katsumi O, Cagliero E, Nathan D, Hirose T. Neurovisual abnormalities preceding the retinopathy in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;39(9):643-8.

López-Gálvez MI, García-Campos JM. [From scientific evidence to clinical practice: treatment protocols for diabetic macular edema]. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2012;87 Suppl 1:38-45.

Lövestam-Adrian M, Holm K. Multifocal electroretinography amplitudes increase after photocoagulation in areas with increased retinal thickness and hard exudates. *Acta Ophthalmol*. 2010;88(2):188-92.

Lu M, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor gene regulation and action in diabetic retinopathy. *Ophthalmol Clin North Am.* 2002;15(1):69-79.

Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9(4):315-27.

Mallet B, Vialettes B, Haroche S, Escoffier P, Gastaut P, Taubert JP, et al. Stabilization of severe proliferative diabetic retinopathy by long-term treatment with SMS 201-995. *Diabete Metab.* 1992;18(6):438-44.

Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, Grunwald JE, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology.* 2012;119(7):1388-98.

Mason JO, Albert MA, Mays A, Vail R. Regression of neovascular iris vessels by intravitreal injection of bevacizumab. *Retina.* 2006;26(7):839-41.

Massin P, Bandello F, Garweg JG, Hansen LL, Harding SP, Larsen M, et al. Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE Study): a 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study. *Diabetes Care.* 2010;33(11):2399-405.

Mastrodimou N, Kiagiadaki F, Hodjarova M, Karagianni E, Thermos K. Somatostatin receptors (sst2) regulate cGMP production in rat retina. *Regul Pept.* 2006;133(1-3):41-6.

McCombe M, Lightman S, Eckland DJ, Hamilton AM, Lightman SL. Effect of a long-acting somatostatin analogue (BIM23014) on proliferative diabetic retinopathy: a pilot study. *Eye (Lond).* 1991;5 ( Pt 5):569-75.

Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Bosch J, Fernandez M. The somatostatin analogue octreotide inhibits angiogenesis in the earliest, but not in advanced, stages of portal hypertension in rats. *J Cell Mol Med.* 2008;12(5A):1690-9.

Mentlein R, Eichler O, Forstreuter F, Held-Feindt J. Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int J Cancer.* 2001;92(4):545-50.

Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors. Studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med.* 1983;309(9):527-30.

Merimee TJ. A follow-up study of vascular disease in growth-hormone-deficient dwarfs with diabetes. *N Engl J Med.* 1978;298(22):1217-22.

Meyer-Schwickerath R, Pfeiffer A, Blum WF, Freyberger H, Klein M, Lösche C, et al. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in nondiabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest.* 1993;92(6):2620-5.

Miceli MV, Liles MR, Newsome DA. Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res.* 1994;214(1):242-9.

Michaelides M, Kaines A, Hamilton RD, Fraser-Bell S, Rajendram R, Quhill F, et al. A prospective randomized trial of intravitreal bevacizumab or laser therapy in the management of diabetic macular edema (BOLT study) 12-month data: report 2. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1078-86.e2.

Millen AE, Gruber M, Klein R, Klein BE, Palta M, Mares JA. Relations of serum ascorbic acid and alpha-tocopherol to diabetic retinopathy in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*. 2003;158(3):225-33.

Millen AE, Klein R, Folsom AR, Stevens J, Palta M, Mares JA. Relation between intake of vitamins C and E and risk of diabetic retinopathy in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):865-73.

Miller JW, Adamis AP, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev*. 1997;13(1):37-50.

Miranda M, Muriach M, Almansa I, Arnal E, Messeguer A, Díaz-Llopez M, Romero FJ, Bosch-Morell F. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(11):1494-8

Missotten T, van Laar JA, van der Loos TL, van Daele PL, Kuijpers RW, Baarsma GS, et al. Octreotide long-acting repeatable for the treatment of chronic macular edema in uveitis. *Am J Ophthalmol*. 2007;144(6):838-43.

Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Massin P, Schlingemann RO, et al. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2011;118(4):615-25.

Mitchell P, Smith W, Wang JJ, Attebo K. Prevalence of diabetic retinopathy in an older community. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1998;105(3):406-11.

Mitchell P, Wong TY, Group DMETGW. Management paradigms for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol*. 2014;157(3):505-13.e1-8.

Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest*. 1996;97(12):2883-90.

Mohr S, Zech B, Lapetina EG, Brüne B. Inhibition of caspase-3 by S-nitrosation and oxidation caused by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238(2):387-91.

Moss SE, Klein R, Klein BE. The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology*. 1998;105(6):998-1003.

Muriach M, Bosch-Morell F, Arnal E, Alexander G, Blomhoff R, Romero FJ. Lutein prevents the effect of high glucose levels on immune system cells in vivo and in vitro. *J Physiol Biochem*. 2008;64(2):149-57.

Network DRCR. A randomized trial comparing intravitreal triamcinolone acetonide and focal/grid photocoagulation for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2008;115(9):1447-9, 9.e1-10.

Ng JS, Bearse MA, Schneck ME, Barez S, Adams AJ. Local diabetic retinopathy prediction by multifocal ERG delays over 3 years. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(4):1622-8.

Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, Boyer DS, Patel S, Feiner L, et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology*. 2012;119(4):789-801.

Nguyen QD, Shah SM, Khwaja AA, Channa R, Hatef E, Do DV, et al. Two-year outcomes of the ranibizumab for edema of the macula in diabetes (READ-2) study. *Ophthalmology*. 2010;117(11):2146-51.

Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl*. 2000;77:S26-30.

Nourinia R, Ahmadi H, Shahheidari MH, Zandi S, Nakao S, Hafezi-Moghadam A. Intravitreal fasudil combined with bevacizumab for treatment of refractory diabetic macular edema; a pilot study. *J Ophthalmic Vis Res*. 2013;8(4):337-40.

Obrosova IG, Minchenko AG, Marinescu V, Fathallah L, Kennedy A, Stockert CM, et al. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 2001;44(9):1102-10.

Orskov H, Thomsen HG, Yde H. Wick chromatography for rapid and reliable immunoassay of insulin, glucagon and growth hormone. *Nature*. 1968;219(5150):193-5.

Ozaki H, Okamoto N, Ortega S, Chang M, Ozaki K, Sadda S, et al. Basic fibroblast growth factor is neither necessary nor sufficient for the development of retinal neovascularization. *Am J Pathol*. 1998;153(3):757-65.

Ozkiriş A. Pattern electroretinogram changes after intravitreal bevacizumab injection for diabetic macular edema. *Doc Ophthalmol*. 2010;120(3):243-50.

Pagès G, Berra E, Milanini J, Levy AP, Pouysségur J. Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J Biol Chem*. 2000;275(34):26484-91.

Palii SS, Afzal A, Shaw LC, Pan H, Caballero S, Miller RC, et al. Nonpeptide somatostatin receptor agonists specifically target ocular neovascularization via the somatostatin type 2 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):5094-102.

Panozzo G, Parolini B, Gusson E, Mercanti A, Pinackatt S, Bertoldo G, et al. Diabetic macular edema: an OCT-based classification. *Semin Ophthalmol*. 2004;19(1-2):13-20.

Papadaki T, Tsilimbaris M, Thermos K, Karavellas M, Samonakis D, Papadakis A, et al. The role of lanreotide in the treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: a pilot clinical trial. *Retina*. 2003;23(6):800-7.

Papadaki T, Zacharopoulos I, Iaccheri B, Fiore T, Foster CS. Somatostatin for Uveitic Cystoid Macular Edema (CME). *Ocul Immunol Inflamm*. 2005;13(6):469-70.

Pareja-Ríos A, Serrano-García MA, Marrero-Saavedra MD, Abrales-López VM, Reyes-Rodríguez MA, Cabrera-López F, et al. [Guidelines of clinical practice of the SERV (Spanish Retina and Vitreous Society): management of ocular complications of diabetes. Diabetic retinopathy and macular oedema]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2009;84(9):429-50.



- Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20(3):157-98.
- Pearson PA, Comstock TL, Ip M, Callanan D, Morse LS, Ashton P, et al. Fluocinolone acetonide intravitreal implant for diabetic macular edema: a 3-year multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Ophthalmology.* 2011;118(8):1580-7.
- Pesce A, Santiago F. Epidemiología de la retinopatía diabética. 2005. En: Alfaro V, Quiroz-Mercado H, Gómez-Ulla F, Figueroa MS, Villalba SJ. *Retinopatía diabética, tratado médico quirúrgico.* Ed Mac Line SL, 35-42
- Petrucci C, Resta V, Fieni F, Bigiani A, Bagnoli P. Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit retina via sst2 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001;363(6):680-94.
- Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Arch Ophthalmol.* 1985;103(12):1796-806.
- Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS Report Number 8. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology.* 1981;88(7):583-600.
- Poulaki V, Jousseaume AM, Mitsiades N, Mitsiades CS, Iliaki EF, Adamis AP. Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am J Pathol.* 2004;165(2):457-69.
- Poulsen JE. Diabetes and anterior pituitary insufficiency. Final course and postmortem study of a diabetic patient with Sheehan's syndrome. *Diabetes.* 1966;15(2):73-7.
- Poulsen JE. Recovery from retinopathy in a case of diabetes with Simmonds' disease. *Diabetes.* 1953;2(1):7-12.
- Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Effects of growth hormone on insulin action in man. Mechanisms of insulin resistance, impaired suppression of glucose production, and impaired stimulation of glucose utilization. *Diabetes.* 1982;31(8 Pt 1):663-9.
- Robison WG, Jacot JL, Katz ML, Glover JP. Retinal vascular changes induced by the oxidative stress of alpha-tocopherol deficiency contrasted with diabetic microangiopathy. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2000;16(2):109-20.
- Rohaizak M, Farndon JR. Use of octreotide and lanreotide in the treatment of symptomatic non-resectable carcinoid tumours. *ANZ J Surg.* 2002;72(9):635-8.
- Romero-Aroca P, Reyes-Torres J, Baget-Bernaldiz M, Blasco-Suñe C. Laser treatment for diabetic macular edema in the 21st century. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(2):100-12.
- Rothova A. Medical treatment of cystoid macular edema. *Ocul Immunol Inflamm.* 2002;10(4):239-46.
- Roy MS, Klein R. Macular edema and retinal hard exudates in African Americans with type 1 diabetes: the New Jersey 725. *Arch Ophthalmol.* 2001;119(2):251-9.

Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, Carretero A, Nacher V, Haurigot V, et al. Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *J Clin Invest*. 2004;113(8):1149-57.

Ruiz-Moreno JM, Montero JA, Lugo F, Amat P, Staicu C. Intravitreal bevacizumab in recurrent diabetic vitreous haemorrhage after vitrectomy. *Acta Ophthalmol*. 2008;86(2):231-2.

Rymaszewski Z, Cohen RM, Chomczynski P. Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(2):617-21.

Sall JW, Klisovic DD, O'Doriso MS, Katz SE. Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2004;79(4):465-76.

Sarlos S, Rizkalla B, Moravski CJ, Cao Z, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL. Retinal angiogenesis is mediated by an interaction between the angiotensin type 2 receptor, VEGF, and angiopoietin. *Am J Pathol*. 2003;163(3):879-87.

Sasaki M, Kawasaki R, Noonan JE, Wong TY, Lamoureux E, Wang JJ. Quantitative measurement of hard exudates in patients with diabetes and their associations with serum lipid levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(8):5544-50.

Schmidt M, Giessel A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1932-5.

Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Holz FG, Schlingemann RO, Lanzetta P, Massin P, et al. Three-year outcomes of individualized ranibizumab treatment in patients with diabetic macular edema: the RESTORE extension study. *Ophthalmology*. 2014;121(5):1045-53.

Sevket O, Sevket A, Molla T, Buyukpinarbasılı N, Uysal O, Yılmaz B, et al. Somatostatin analogs regress endometriotic implants in rats by decreasing implant levels of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9. *Reprod Sci*. 2013;20(6):639-45.

Sfikakis PP, Grigoropoulos V, Emfietzoglou I, Theodossiadis G, Tentolouris N, Delicha E, et al. Infliximab for diabetic macular edema refractory to laser photocoagulation: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover, 32-week study. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1523-8.

Shah SM, Nguyen QD, Mir HS, Polito A, Hafiz G, Tatlipinar S, et al. A randomized, double-masked controlled clinical trial of Sandostatin long-acting release depot in patients with postsurgical cystoid macular edema. *Retina*. 2010;30(1):160-6.

Sharp PS, Fallon TJ, Brazier OJ, Sandler L, Joplin GF, Kohner EM. Long-term follow-up of patients who underwent yttrium-90 pituitary implantation for treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 1987;30(4):199-207.

Shoeibi N, Ahmadiéh H, Entezari M, Yaseri M. Intravitreal Bevacizumab with or without Triamcinolone for Refractory Diabetic Macular Edema: Long-term Results of a Clinical Trial. *J Ophthalmic Vis Res*. 2013;8(2):99-106.

Simó R, Carrasco E, Fonollosa A, García-Arumí J, Casamitjana R, Hernández C. Deficit of somatostatin in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care*. 2007;30(3):725-7.

Simó R, Lecube A, Sararols L, García-Arumí J, Segura RM, Casamitjana R, et al. Deficit of somatostatin-like immunoreactivity in the vitreous fluid of diabetic patients: possible role in the development of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2002;25(12):2282-6.

Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:190724.

Simunovic MP, Hunyor AP, Ho IV. Vitrectomy for diabetic macular edema: a systematic review and meta-analysis. *Can J Ophthalmol*. 2014;49(2):188-95.

Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, et al. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science*. 1997;276(5319):1706-9.

Soheilian M, Garfami KH, Ramezani A, Yaseri M, Peyman GA. Two-year results of a randomized trial of intravitreal bevacizumab alone or combined with triamcinolone versus laser in diabetic macular edema. *Retina*. 2012;32(2):314-21.

Song MK, Roufogalis BD, Huang TH. Reversal of the Caspase-Dependent Apoptotic Cytotoxicity Pathway by Taurine from *Lycium barbarum* (Goji Berry) in Human Retinal Pigment Epithelial Cells: Potential Benefit in Diabetic Retinopathy. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:323784.

Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina*. 2006;26(3):275-8.

Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):19-31.

Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science*. 1992;257(5074):1220-4.

Stewart MW. Anti-VEGF therapy for diabetic macular edema. *Curr Diab Rep*. 2014;14(8):510.

Sultan MB, Zhou D, Loftus J, Dombi T, Ice KS, Group MS. A phase 2/3, multicenter, randomized, double-masked, 2-year trial of pegaptanib sodium for the treatment of diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2011;118(6):1107-18.

Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, Miyahara S, Katsuta H, Hirose F, et al. Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(4):1440-4.

Tawfik A, Sanders T, Kahook K, Akeel S, Elmarakby A, Al-Shabrawey M. Suppression of retinal peroxisome proliferator-activated receptor gamma in experimental diabetes and oxygen-induced retinopathy: role of NADPH oxidase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(2):878-84.

Thermos K. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res*. 2003;43(17):1805-15.

Tolentino MJ, McLeod DS, Taomoto M, Otsuji T, Adamis AP, Luttj GA. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol*. 2002;133(3):373-85.

Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology*. 1996;103(11):1820-8.

Tonello M, Costa RA, Almeida FP, Barbosa JC, Scott IU, Jorge R. Panretinal photocoagulation versus PRP plus intravitreal bevacizumab for high-risk proliferative diabetic retinopathy (IBeHi study). *Acta Ophthalmol*. 2008;86(4):385-9.

Treatment techniques and clinical guidelines for photocoagulation of diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 2. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1987;94(7):761-74.

Tzekov R, Arden GB. The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol*. 1999;44(1):53-60.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.

van Hagen PM, Baarsma GS, Mooy CM, Ercoskan EM, ter Averst E, Hofland LJ, et al. Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases. *Eur J Endocrinol*. 2000;143 Suppl 1:S43-51.

van Hagen PM, Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Anker-Lugtenburg PJ, Löwenberg B, et al. Somatostatin and the immune and haematopoietic system; a review. *Eur J Clin Invest*. 1994;24(2):91-9.

Vander JF, Duker JS, Benson WE, Brown GC, McNamara JA, Rosenstein RB. Long-term stability and visual outcome after favorable initial response of proliferative diabetic retinopathy to panretinal photocoagulation. *Ophthalmology*. 1991;98(10):1575-9.

Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med*. 2002;251(2):87-101.

Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulan G, et al. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(3):C695-704.

Westlund BS, Cai B, Zhou J, Sparrow JR. Involvement of c-Abl, p53 and the MAP kinase JNK in the cell death program initiated in A2E-laden ARPE-19 cells by exposure to blue light. *Apoptosis*. 2009;14(1):31-41.

Wilkinson CP FF, Klein R, Lee P, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R, Verdaguer TJ. Proposed International Clinical Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular edema Disease Severity scales. *Ophthalmology*. 2003;110:1667-82.

Wilkinson-Berka JL, Wraight C, Werther G. The role of growth hormone, insulin-like growth factor and somatostatin in diabetic retinopathy. *Curr Med Chem*. 2006;13(27):3307-17.

Williams M, Hogg RE, Chakravarthy U. Antioxidants and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2013;13(4):481-7.

Wright AD, Kohner EM, Oakley NW, Hartog M, Joplin GF, Fraser TR. Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation. *Br Med J*. 1969;2(5653):346-8.

Wu L, Hernandez-Bogantes E, Roca JA, Arevalo JF, Barraza K, Lasave AF. intravitreal tumor necrosis factor inhibitors in the treatment of refractory diabetic macular edema: a pilot study from the Pan-American Collaborative Retina Study Group. *Retina*. 2011;31(2):298-303.

Yetkin DO, Boysan SN, Tiryakioglu O, Yalin AS, Kadioglu P. Forty month follow-up of persistent and difficultly controlled acromegalic patients treated with depot long acting somatostatin analog octreotide. *Endocr J*. 2007;54(3):459-64.

Yolcu U, Sobaci G. The effect of combined treatment of bevacizumab and triamcinolone for diabetic macular edema refractory to previous intravitreal mono-injections. *Int Ophthalmol*. 2014.

Zeng K, Xu H, Mi M, Chen K, Zhu J, Yi L, et al. Effects of taurine on glial cells apoptosis and taurine transporter expression in retina under diabetic conditions. *Neurochem Res*. 2010;35(10):1566-74.

Zeng K, Xu H, Mi M, Zhang Q, Zhang Y, Chen K, et al. Dietary taurine supplementation prevents glial alterations in retina of diabetic rats. *Neurochem Res*. 2009;34(2):244-54.

Zhang ZH, Liu HY, Hernandez-Da Mota SE, Romano MR, Falavarjani KG, Ahmadi H, et al. Vitrectomy with or without preoperative intravitreal bevacizumab for proliferative diabetic retinopathy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Ophthalmol*. 2013;156(1):106-15.e2.

Zwang Y, Yarden Y. p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *EMBO J*. 2006;25(18):4195-206.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGF	Angiografía fluoresceínica
AMIR	Anomalías vasculares intrarretinianas
AV	Agudeza visual
bFGF	Factor básico de crecimiento de los fibroblastos
BHR	Barrera hematorretiniana
C + S	Grupo de controles tratados con somatulina
C	Grupo de controles no tratados
D + S	Grupo de diabéticos tratados con somatulina
D	Grupo de diabéticos no tratados
DM	Diabetes Mellitus
DMID	Diabetes Mellitus Insulin Dependiente
DMNID	Diabetes Mellitus No Insulin Dependiente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRS	Diabetic Retinopathy Study
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMCS	Edema macular clínicamente significativo
EMD	Edema Macular Diabético
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electrorretinograma
ERK	Quinasas extracelulares
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group
FR	Fotorreceptores
GH	Hormona del crecimiento
GSH	Glutation
HBSS	Hank's Balanced SALT solution sin calcio ni magnesio
HTA	Hipertensión arterial
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
JNK	c-Jun-N-terminal quinasas
MAPK	Proteín quinasas activadas por mitógenos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-kB	Factor nuclear potenciador de cadenas kappa de células B activadas
NOS	Enzima óxido nítrico sintasa/Especies reactivas del nitrógeno
OCT	Tomografía de coherencia óptica
PBS	Fosfato buffer salino

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFC	Panfotocoagulación
PKC	Proteinquinasa C
RD	Retinopatía Diabética
RDNP	Retinopatía diabética no proliferativa
RDP	Retinopatía diabética proliferativa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
S	Somatulina Autogel
SST	Somatostatina
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WESDR	Wisconsin Epidemiologic Study of Retinopathy



## LISTA DE FIGURAS

# INTRODUCCIÓN

## 1 RETINOPATÍA DIABÉTICA

Figura 1. Representación gráfica de los diferentes cambios implicados en la fisiopatología de la RD. PKC: Proteín quinasa C; BHR: Barrera hematorretiniana.

Figura 2. Fotografía y angiografía de un caso de RDNP leve, en la que únicamente se observan microaneurismas (flecha).

Figura 3. Fotografía y angiografía de un caso de RDNP moderada, con exudados duros, un exudado algodonoso y una hemorragia retiniana.

Figura 4. Fotografía y angiografía de un caso de RDNP severa con numerosas hemorragias intrarretinianas e importantes áreas de isquemia en la angiografía.

Figura 5. Fotografía y angiografía de un caso de RDP con neovasos en la papila (flecha) y abundantes áreas de isquemia en retina periférica.

Figura 6. Fotografía e imágenes de la OCT de Cirrus mostrando un EMCS con engrosamiento retiniano y exudados duros dentro de las 500 µm del centro de la mácula. DD: Diámetro de disco.

Figura 7. Imágenes fundoscópicas y angiográficas de los diferentes tipos de EM según la AGF. A) EM focal; B) EM multifocal; C) EM difuso de tipo quístico.

Figura 8. Imágenes de OCT que muestran diferentes tipos de EMD: A) EM esponjiforme; B) EM quístico; C) EM con desprendimiento de neuroepitelio; D) EM con tracción anteroposterior.

Figura 9. Fotografías retinianas de campo amplio que muestran dos casos de RDP con abundantes neovasos (izquierda) y proliferaciones fibrovasculares desencadenando un desprendimiento de retina traccional.

Figura 10. Fotografía retiniana, angiografía y autofluorescencia que muestran las cicatrices de una PFC y fotocoagulación en rejilla con láser PASCAL.

## 2 ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS

Figura 11. La situación de predominio de sustancias pro-oxidantes sobre las antioxidantes se denomina estrés oxidativo.

Figura 12. Esquema de la interrelación entre RD, estrés oxidativo y apoptosis. Adaptada de Kowluru R, Experimental Diabetes Research 2007.

## 3 SOMATOSTATINA

Figura 13. Esquema que representa las interacciones del eje hipotálamo-hipofisario-GH. SST: Somatostatina, GHRH: Hormona liberadora de la hormona del crecimiento, GH: Hormona del crecimiento, IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1.

Figura 14. Composición de la SST y los análogos comercializados. Adaptado de Catalá M, 2005.

Figura 15. Esquema resumen de los mecanismos de acción de la SST.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1 ESTUDIO EXPERIMENTAL

Figura 16. Método de conteo celular empleando la cámara de Neubauer.

Figura 17. Esquema que representa los cuatro grupos de cultivos celulares establecidos en el estudio.

Figura 18. Esquema de las diferentes fases que constituyeron el presente ensayo, para el grupo de células tratadas con glucosa y somatulina.

Figura 19. Esquema que representa la técnica de inmunoperoxidasa. La enzima se acopla al Ac secundario que se une al complejo antígeno-Ac primario.

## 2 ESTUDIO CLÍNICO

Figura 20. Imagen de las diferentes presentaciones de Somatulina Autogel® comercializadas por IPSEN PHARMA.

# RESULTADOS

## 1 ESTUDIO EXPERIMENTAL

Figura 21. Inmunohistoquímica frente al marcador de angiogénesis VEGF. Las dos figuras superiores representan los tejidos controles y diabéticos no tratados con somatulina. Las dos figuras inferiores, los tejidos tratados con somatulina. Las células teñidas de color marrón indican positividad para el VEGF. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

Figura 22. Gráfica donde se representa la expresión del marcador de angiogénesis VEGF en cada uno de los grupos. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina. \* $p < 0,05$ .

Figura 23. Inmunohistoquímica que muestra la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3. Las dos figuras superiores representan los tejidos controles y diabéticos no tratados con somatulina. Las dos figuras inferiores, los tejidos tratados con somatulina. Las células teñidas de color marrón indican positividad para la caspasa-3. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

Figura 24. Gráfica donde se representa la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3 en cada uno de los grupos. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina. \* $p < 0,05$ .

Figura 25. Inmunohistoquímica que muestra la expresión del marcador de estrés oxidativo JNK. Las dos figuras superiores representan los tejidos controles y diabéticos no tratados con somatulina. Las dos figuras inferiores, los tejidos tratados con somatulina. Las células teñidas de color marrón indican positividad para la JNK. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

Figura 26. Gráfica donde se representa la expresión del marcador de estrés oxidativo JNK en cada uno de los grupos. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina. \* $p < 0,05$ .

Figura 27. Gráfico de dispersión donde se observa la correlación directa encontrada entre el VEGF y la caspasa-3, con un p valor de 0,025.

Figura 28. Gráfico de dispersión donde se observa la correlación directa encontrada entre el VEGF y la JNK, con un p valor de 0,016.

Figura 29. Gráfico de dispersión donde se observa la correlación directa encontrada entre la caspasa-3 y JNK, con un p valor de 0,029.

## 2 ESTUDIO CLÍNICO

Figura 30. Gráfico que representa el tipo de tratamiento recibido para la DM en la visita basal. ADO: Antidiabéticos orales.

Figura 31. Gráfico que representa el grado de RD en la visita basal. RDNP MOD: Retinopatía diabética no proliferativa moderada; RDNP SEV: Retinopatía diabética no proliferativa severa; RDP: Retinopatía diabética proliferativa.

Figura 32. Gráfico que representa la distribución de los espesores medios del edema macular en la visita basal.

Figura 33. Representación gráfica de la evolución de la AV media en número de letras leídas a 4 metros.

Figura 34. Representación gráfica de la comparativa en el número de letras medio leídas a 4 metros en la primera visita y la última, tras 12 meses de tratamiento. \* $p < 0,05$ .

Figura 35. Representación gráfica de la variación en el número de letras leídas a 4 metros entre la primera y última visita por intervalos.

Figura 36. Representación gráfica de la evolución del grosor macular central medio medido mediante Cirrus-OCT.

Figura 37. Representación gráfica de la evolución del grosor foveal medio medido mediante Stratus-OCT.

Figura 38. Representación gráfica del cambio en el grosor macular central medio y grosor foveal entre la primer (T0) a y la última visita (T1). \* $p < 0,05$ .

Figura 39. Representación gráfica por intervalos de la variación en el grosor foveal medido por Cirrus-OCT entre la primera y última visita.

Figura 40. Representación gráfica por intervalos de la variación en el grosor foveal medido por Stratus-OCT entre la primera y última visita.

Figura 41. Representación gráfica de la evolución del volumen macular medio medido mediante Cirrus-OCT y Stratus-OCT.

Figura 42. Representación gráfica del cambio en el volumen macular medio entre la primera (T0) y la última visita (T1). \* $p < 0,05$ .

Figura 43. Representación gráfica de la evolución del volumen foveal medio medido mediante Stratus-OCT.

Figura 44. Representación gráfica del cambio en el volumen foveal medio entre la primera (T0) y la última visita (T1). \* $p < 0,05$ .

Figura 45. Representación gráfica de la comparativa de la latencia de respuesta media entre la visita basal y después de 12 meses de tratamiento con Somatulina.

Figura 46. Representación gráfica de la comparativa de la amplitud de respuesta media entre la visita basal y después de 12 meses de tratamiento con Somatulina.

Figura 47. Representación gráfica de la comparativa de la amplitud media de cada uno de los anillos concéntricos del ERG multifocal entre la visita basal y después de 12 meses de tratamiento con Somatulina.

Figura 48. Representación gráfica de los cambios en el colesterol total y triglicéridos medios entre la primera (T0) y la última visita (T1). \* $p < 0,05$ .

Figura 49. Representación gráfica de los cambios en la proteinuria media entre la primera (T0) y la última visita (T1). \* $p < 0,05$ .

Figura 50. Representación gráfica de los cambios en la puntuación global del cuestionario específico de función visual VF-14 entre la primera (T0) y última visita (T1).

Figura 51. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 1 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 52. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 2 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 53. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 3 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 54. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 4 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 55. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 5 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 56. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 6 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 57. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 7 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 58. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 8 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 59. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 9 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 60. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 10 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 61. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 11 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 62. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 12 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 63. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 13 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 64. Representación gráfica de las respuestas para el ítem 14 del cuestionario específico de función visual VF-14.

Figura 65. Representación gráfica del porcentaje de pacientes que presentaban efectos adversos locales en cada una de las visitas del estudio.

Figura 66. Representación gráfica del porcentaje de pacientes que presentaron algún efecto adverso local durante el seguimiento.

Figura 67. Representación gráfica del porcentaje de pacientes que presentaban efectos adversos sistémicos en cada una de las visitas del estudio.

## DISCUSIÓN

### 1 ESTUDIO EXPERIMENTAL

Figura 68. Representación de los mecanismos de acción de los análogos de la SST descritos previamente por otros autores junto los nuevos mecanismos que aportamos en este trabajo (5 y 6).

Figura 69. Representación de la relación entre los diferentes marcadores estudiados en este trabajo. La disminución de la JNK implica una menor apoptosis celular y una disminución en la expresión del VEGF en el EPR. La administración de somatulina produce una disminución en los tres marcadores.

### 2 ESTUDIO CLÍNICO

Figura 70. Esquema que resume las guías de tratamiento actuales del EMD.

Figura 71. (A-B) Imágenes de OCT Cirrus en la primera visita antes de iniciar el tratamiento con 670  $\mu\text{m}$  de espesor central en el ojo derecho (A) y 887  $\mu\text{m}$  en el izquierdo (B). (C-D) Oct de ambos ojos después de 12 meses de tratamiento, pudiendo observarse una reducción significativa en el EM alcanzando 316  $\mu\text{m}$  en el ojo derecho (C) y 251  $\mu\text{m}$  en el izquierdo.

Figura 72. (A-B) Fotografías retinianas antes de iniciar el tratamiento con Somatulina, observándose importantes exudados retinianos en ambos ojos. (C-D) Imágenes retinianas después del tratamiento, donde puede verse como se han reabsorbido la mayoría de exudados.

Figura 73. Esquema que resume las guías de tratamiento actuales del EMD junto a las posibles futuras indicaciones de la Somatulina.

## LISTA DE TABLAS

# INTRODUCCIÓN

## 1 RETINOPATÍA DIABÉTICA

Tabla 1. Resumen de los principales factores proangiogénicos y antiangiogénicos.

Tabla 2. Clasificación clínica internacional de la RD (Wilkinson CP, 2003). RDNP: retinopatía diabética no proliferativa. RDP: retinopatía diabética proliferativa. MA: microaneurismas. AMIR: anomalías microvasculares intrarretinianas.

Tabla 3. Clasificación Internacional del Edema Macular (Wilkinson CP, 2003). EMD: edema macular diabético.

Tabla 4. EMCS (E. T. D. R. S. R. Group, 1985)

\*Aproximadamente 1/3 del diámetro papilar

Tabla 5. Resumen de los resultados de los principales estudios con fármacos antiangiogénicos para el tratamiento del EMD.

Tabla 6. Resumen de los resultados de los principales estudios con corticoides para el tratamiento del EMD.

## 2 ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS

Tabla 7. Resumen de las principales ROS y sustancias antioxidantes.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1 ESTUDIO EXPERIMENTAL

Tabla 8. Protocolos de inmunohistoquímica para los distintos Ac utilizados en este estudio.

\*CC1 y CC2 son diferentes soluciones acondicionadoras (ver apartado 1.3.4.)

## 2 ESTUDIO CLÍNICO

Tabla 9. Resumen de las pruebas realizadas en cada una de las visitas del estudio.

Tabla 10. Items y respuestas del Índice de Función Visual VF-14

# RESULTADOS

## 1 ESTUDIO EXPERIMENTAL

Tabla 11 Resultados de la medida de la expresión del VEGF en los diferentes grupos expresadas como porcentaje de células positivas para el VEGF sobre las células totales. Grupo control:  $79,45 \pm 4,85$ ; Grupo diabéticos:  $94,14 \pm 6,10$ ; Grupo control tratados con somatulina:  $72,19 \pm 11,79$ ; Grupo diabéticos tratados con somatulina:  $80,59 \pm 2,98$ .



Tabla 12. Comparación de medias entre los diferentes grupos entre sí con la t de Student y resultados de p para cada comparación. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

Tabla 13. Resultados de la medida de la expresión de caspasa-3 en los diferentes grupos expresadas como porcentaje de células positivas para el caspasa-3 sobre las células totales. Grupo control:  $55,80 \pm 8,99$ ; Grupo diabéticos:  $77,15 \pm 12,48$ ; Grupo control tratados con somatulina:  $49,99 \pm 8,48$ ; Grupo diabéticos tratados con somatulina:  $47,39 \pm 11,91$ .

Tabla 14. Comparación de medias entre los diferentes grupos entre sí con la t de Student y resultados de p para cada comparación. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

Tabla 15. Resultados de la medida de la expresión de JNK en los diferentes grupos expresadas como porcentaje de células positivas para el JNK sobre las células totales. Grupo control:  $41,34 \pm 4,85$ ; Grupo diabéticos:  $55,49 \pm 4,81$ ; Grupo control tratados con somatulina:  $38,49 \pm 10,68$ ; Grupo diabéticos tratados con somatulina:  $35,76 \pm 6,17$ .

Tabla 16. Comparación de medias entre los diferentes grupos entre sí con la t de Student y resultados de p para cada comparación. C=Controles no tratados, D=Diabéticos no tratados, C+S=Controles tratados con somatulina, D+S=Diabéticos tratados con somatulina.

Tabla 17. Resumen de correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados

## 2 ESTUDIO CLÍNICO

Tabla 18. Edad media, desviación típica, mínima, máxima y mediana de la muestra.

Tabla 19. Distribución de la muestra a estudio según sexos.

Tabla 20. Representación de la muestra según el tipo de diabetes.

Tabla 21. Tiempo de evolución de la DM medio, desviación típica, mínimo, máximo y mediana de la muestra.

Tabla 22. Peso medio, desviación típica, mínimo, máximo y mediana de la muestra.

Tabla 23. Talla media, desviación típica, mínima, máxima y mediana de la muestra.

Tabla 24. Índice de masa corporal (IMC) medio, desviación típica, mínima, máxima y mediana de la muestra.

Tabla 25. Grosor macular medio, desviación típica, mínima, máxima y mediana de la muestra medida mediante OCT-Cirrus.

Tabla 26. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el número de letras leídas a 4 metros en la muestra de 26 ojos.

Tabla 27. Resumen de los resultados del test T Student para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 28. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el grosor macular central medido con Cirrus-OCT en la muestra de 26 ojos.

Tabla 29. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el grosor foveal medido con Stratus-OCT en la muestra de 26 ojos.

Tabla 30. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del grosor macular central medido por Cirrus-OCT representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 31. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del grosor foveal medido por Stratus-OCT representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 32. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el volumen macular medido con Cirrus-OCT en la muestra de 26 ojos.

Tabla 33. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el volumen macular medido con Stratus-OCT en la muestra de 26 ojos.

Tabla 34. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del volumen macular medido con Cirrus-OCT representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 35. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del volumen macular medido con Stratus-OCT representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 36. Medidas estadísticas descriptivas de centralización (media, mediana) y de dispersión (desviación típica) para el volumen foveal medido con Stratus-OCT en la muestra de 26 ojos.

Tabla 37. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina del volumen foveal medido con Stratus-OCT representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 38. Resumen de los resultados la prueba de T Student para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina de la latencia de respuesta, representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 39. Resumen de los resultados la prueba de T Student para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina de la amplitud de respuesta, representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 40. Resumen de los resultados la prueba de T Student para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) con Somatulina de la amplitud media para cada uno de los anillos concéntricos del ERG multifocal representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 41. Resumen de los resultados la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre (T0) y post-tratamiento (T1) en la presión arterial y parámetros analíticos representados como media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 42. Resumen de las puntuaciones globales para cada paciente en las visita inicial (T0) y final (T1) y resultado de la prueba de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre y post-tratamiento en el test específico de función visual VF-14.

Tabla 43. Resumen de los resultados del test de Wilcoxon (Wi) para el análisis de las variaciones pre y post-tratamiento con Somatulina en cada una de las preguntas del cuestionario específico de función visual VF-14.

Tabla 44. Resumen de los efectos adversos locales observados en cada una de las visitas del estudio, representados como número de pacientes y porcentaje.

Tabla 45. Resumen de los efectos adversos sistémicos observados en cada una de las visitas del estudio, representados como número de pacientes y porcentaje.

## DISCUSION

### **2 ESTUDIO CLÍNICO**

Tabla 46. Resumen de los resultados visuales de los principales estudios con tratamientos utilizados para EMD persistentes, junto con los obtenidos en esta tesis.

Tabla 47. Resumen del cambio en grosor central retiniano (GCR) en los principales estudios con EMD que describieron los resultados a un año de tratamiento, junto con los obtenidos en esta tesis



Anexo con el consentimiento informado utilizado en el estudio clínico y los cuestionarios utilizados para el registro de los datos.

## **CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL TRATAMIENTO DE ANÁLOGOS DE LA SOMATOSTATINA EN EL EDEMA MACULAR DIABÉTICO**

**Antes de iniciar tratamiento con Somatulina Autogel® es necesario que lea atentamente esta información**

### **Objeto del tratamiento:**

El edema macular diabético es una patología ocular derivada de la Diabetes Mellitus. El tratamiento con Somatulina Autogel® para tal patología es de uso compasivo y se pretende con él mejorar su estado clínico disminuyendo el edema macular y estabilizando o mejorando la agudeza visual. Para controlar la evolución y los resultados del tratamiento se realizará un seguimiento exhaustivo de su caso realizando revisiones periódicas.

### **Procedimientos**

Si consiente en participar en el tratamiento se le realizarán pruebas diagnósticas para asegurar que puede beneficiarse de éste y también otras de seguimiento; entre las que se incluyen (siempre que según la opinión del médico responsable de su seguimiento sea conveniente): bioquímica sanguínea periódica, electroretinograma, medición de edema macular mediante tomografía ocular computerizada, ecografía biliar, angiografía fluoresceíngrafía macular, exploración fundoscópica y agudeza visual mediante la escala ETDRS entre otras.

La duración del tratamiento dependerá de la opinión facultativa de su médico responsable.

### **Destino de las muestras**

La muestra de sangre que se le extraiga será utilizada solamente para cumplir con los objetivos señalados en el estudio. Quedará almacenada en la FOM y destruida (según la normativa legal) una vez acabado el estudio.

### **Beneficios económicos:**

Por tratarse de la determinación de los resultados de un tratamiento médico, al firmar este documento "no espero, beneficio económico actual ni futuro como consecuencia de mi tratamiento. El sometimiento a evaluación se realiza sin ánimo de lucro".

### **Riesgos:**

Debe ser consciente de que no existen garantías absolutas de que el resultado del procedimiento sea el más satisfactorio. También entiende los riesgos derivados del tratamiento específico.

Los relacionados con las pruebas diagnósticas (para las que se realizará un consentimiento informado adecuado siempre que éstas lo requieran).

La experiencia previa en pacientes tratados con Somatulina Autogel® muestra que las reacciones adversas sistémicas al fármaco son similares a las registradas con otros análogos de la somatostatina: síntomas abdominales (diarrea, dolor abdominal, gases, deposiciones claras, náuseas y vómitos), cansancio o pérdida de apetito. Es posible también la formación de barro biliar y de piedras en la vesícula.

Al igual que con otras inyecciones puede notarse dolor localizado, picor o enrojecimiento en la zona. En ocasiones, tras la inyección, Somatulina Autogel® puede palparse bajo la piel en forma de induración.

Si Ud. es diabético, debe saber que Somatulina Autogel® podría modificar las cifras de azúcar (glucemia) por lo que su médico controlará estos niveles de una forma más exhaustiva. Si necesita insulina para el control de su diabetes, inicialmente su endocrino podría reducir la dosis para, posteriormente, ir ajustando en función de los niveles de glucemia que vaya presentando.

Si Ud. acepta recibir este tratamiento, debe conocer que para ello requerirá que visite el centro hospitalario con mayor frecuencia, ya que deberá acudir al mismo cada 4 semanas (aproximadamente) para que le sea administrada la medicación y con carácter periódico se le hará una reevaluación completa de su enfermedad.

### **Suspensión del tratamiento**

Si mientras dura el procedimiento terapéutico con Somatulina Autogel® precisara ser tratado con Ciclosporina u otro fármaco que pudiera afectar al efecto de lanreótida, debe informar inmediatamente al oftalmólogo responsable de su seguimiento y puede que deba abandonar el tratamiento por orden facultativa.

Si es Ud. una mujer con riesgo de quedar embarazada, deberá tomar medidas anticonceptivas apropiadas. Si tiene alguna duda debe consultar con su médico. Se le realizará una prueba de embarazo antes del inicio del tratamiento. Si quedase embarazada a lo largo del mismo debería abandonar la medicación Somatulina Autogel®. Si Ud. presentase alguna reacción adversa y su médico así lo considerase, deberá finalizar el tratamiento.

Deberá informar a su médico responsable de cualquier reacción adversa que relacione con la medicación así como de cualquier enfermedad que padezca a lo largo del proceso terapéutico.

## **CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL TRATAMIENTO DE ANÁLOGOS DE LA SOMATOSTATINA EN EL EDEMA MACULAR DIABÉTICO**

### **Confidencialidad**

Toda la información obtenida será considerada confidencial y será usada sólo a efectos de investigación sobre el edema macular diabético. Los datos obtenidos serán tratados según la Ley de protección de datos vigente (LO 15/99, de 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal).

El acceso a su información personal quedará restringido a los médicos y colaboradores de los que depende su tratamiento, quienes estarán sometidos al deber de secreto inherente a su profesión, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos.

### **Preguntas**

D. /Dña. ...., responsable (ayudante) de la investigación en este Centro ha discutido esta información conmigo y se ha ofrecido a responder a mis preguntas.

Debe Ud. saber que el Dr. ...., del Servicio de Oftalmología de la Fundación Oftalmológica del Mediterráneo es el médico encargado del seguimiento del tratamiento

En caso de necesidad o urgencia, puede contactar con él a través del teléfono 962328100.

### **Derecho a rehusar**

Su participación en este tratamiento y seguimiento de su evolución es totalmente voluntaria y es libre de tomar parte o no sin afectar ni poner en peligro su atención médica futura. Podrá abandonar el tratamiento cuando lo desee, aunque se aconseja que lo comunique a su médico en aras del correcto control de su estado de salud. También podrá rectificar y cancelar sus datos si lo deseara.

### **Consentimiento**

"Consiento en participar en este procedimiento terapéutico sujeto a evaluación. He recibido una copia de este impreso y he tenido oportunidad de leerla".

Al firmar la hoja de consentimiento se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Debe ser consciente que sólo deberá firmarlo si:

- Ha leído esta hoja de información.
- Ha podido hacer preguntas sobre el tratamiento.
- Comprenda que su participación es voluntaria y que puede suspender el tratamiento.
- Preste su libre conformidad para recibir el tratamiento.

D/Dña:

DNI:

Fecha:

Firma del paciente

Firma del médico

---

### **Revocación**

D. /Dña. ....con DNI:

Como: ..... revoco el consentimiento prestado en la fecha: ....., y no deseo proseguir en el estudio referido anteriormente, dándolo por finalizado en la fecha: .....

Firma del paciente

Firma del médico

**CUESTIONARIO 1A** **FECHA (dd/mm/aaaa):** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ **ID#:** \_\_\_\_\_

<b>Edad (años):</b>	<b>Sexo (v/h):</b>	<b>Peso (Kg):</b>	<b>Talla (cm):</b>
<b>DIABETES MELLITUS (DM)</b>			
Tipo DM (tipo 2): 1.SI			
Tratamiento DM (Dieta/ Antidiabéticos Orales/ Insulina):			
Tiempo evolución DM (años):			
<b>PRESION ARTERIAL</b>		P.A. Sistólica (mmHg):	P.A. Diastólica (mmHg):
<b>ANALITICA</b>		Insulinemia (mu/ml):	Colesterol total (mg/dl):
Glucemia ayunas (mg/dl):		IGF1 (mu/ml):	HDL colesterol (mg/dl):
HbA1c (%)			LDL colesterol (mg/dl):
Albuminuria (mg/24 horas):			Triglicéridos (mg/dl):
Creatinina (mg/dl):			
<b>ECOGRAFIA BILIAR:</b>			
<b>OTRAS PATOLOGIAS:</b>			
<b>TRATAMIENTOS CONCOMITANTES:</b>			



**CUESTIONARIO 1B**

FECHA (dd/mm/aaaa): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ID#: \_\_\_\_\_

<b>EXPLORACION FUNDUSCOPICA</b>	<b>OD</b>	<b>OI</b>
<b>RETINOPATIA DIABETICA (RD):</b> 0. No aparente retinopatía. 1. RD no proliferativa grado LEVE. 2. RD no proliferativa grado MODERADO. 3. RD no proliferante grado SEVERO. 4. RD proliferante		
<b>EDEMA MACULAR:</b> 0. No edema macular. 1. Presencia de edema macular.		
<b>ANGIOFLUORESCEINGRAFÍA MACULAR (AFG)</b>		
<b>TRATAMIENTOS PREVIOS:</b> 0. Ninguno. 1. Panretinofotocoagulación. 2. Fotocoagulación macular. 3. Corticoides intraoculares. 4. Anti-VEGF. 5. Vitrectomía posterior.		
<b>OTRA PATOLOGIA OCULAR:</b> 0. No. 1. Alteración corneal 2. Opacidad de cristalino. 3. DMAE. 4. Miopía magna. 5. OTRA (especificar):		

**CUESTIONARIO 1C** \_\_\_\_\_ **FECHA (dd/mm/aaaa):** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**ID#:** \_\_\_\_\_

Fila	Chart 1 a 4 METROS	Nº correcto letras (OD)	Chart 2 a 4 METROS	Nº correcto letras (OI)
1	NCKZO		DSRKN	
2	RHSDK		CKZOH	
3	DOVHR		ONRKD	
4	CZRHS		KZVDC	
5	ONHRC		VSHZO	
6	DKSNV		HDKCR	
7	ZSOKN		CSRHN	
8	CKDNR		SVZDK	
9	SRZKD		NCVOZ	
10	HZOVC		RHSDV	
11	NVDOK		SNROH	
12	VHCNO		ODHKR	
13	SVHCZ		ZKCSN	
14	OZDVK		CRHDV	
TOTAL			TOTAL	
Fila	Chart 1 a 1 METRO	Nº correcto letras (OD)	Chart 2 a 1 METRO	Nº correcto letras (OI)
1	NCKZO		DSRKN	
2	RHSDK		CKZOH	
3	DOVHR		ONRKD	
4	CZRHS		KZVDC	
5	ONHRC		VSHZO	
6	DKSNV		HDKCR	
TOTAL			TOTAL	

CUESTIONARIO 1D

FECHA (dd/mm/aaaa): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ID#: \_\_\_\_\_

	OD	OI
<b>EXPLORACION MACULAR-FOVEOLAR</b>		
<b>Electroretinograma Pattern (ERG-P)</b>	Latencia (ms):  Amplitud ( $\mu$ V):	Latencia (ms):  Amplitud ( $\mu$ V):
<b>Electroretinograma Multifocal (ERG-MF)</b>	Medida 1 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 2 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 3 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 4 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 5 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 6 (nV/grados <sup>2</sup> ):	Medida 1 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 2 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 3 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 4 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 5 (nV/grados <sup>2</sup> ): Medida 6 (nV/grados <sup>2</sup> ):
<b>Stratus OCT</b>	<b>Fast macular:</b> Fovea (mm <sup>3</sup> ): Mácula (mm <sup>3</sup> ):  <b>Cross hair-fovea (<math>\mu</math>m):</b>	<b>Fast macular:</b> Fovea (mm <sup>3</sup> ): Mácula (mm <sup>3</sup> ):  <b>Cross hair-fovea (<math>\mu</math>m):</b>
<b>Cirrus OCT</b>	Cube macular (mm <sup>3</sup> ):  Five line faster-central ( $\mu$ m):	Cube macular (mm <sup>3</sup> ):  Five line faster-central ( $\mu$ m):



