

Fracción activa del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) en el tratamiento de la neovascularización coroidea en modelo animal de degeneración macular asociada a la edad

---

TESIS DOCTORAL, 2015

Josep Badal Lafulla





Universitat Autònoma de Barcelona  
Departamento de Cirugía

# Fracción activa del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) en el tratamiento de la neovascularización coroidea en modelo animal de degeneración macular asociada a la edad

**Josep Badal Lafulla**

*Tesis doctoral*

*Directores:*

Dr. Miguel Ángel Zapata Victori  
Prof. José García-Arumí

Barcelona, noviembre de 2015

© 2015 Josep Badal Lafulla

© 2015 Universitat Autònoma de Barcelona

Diagramación e ilustraciones:

**Ilustración Médica**

[www.ilustracionmedica.es](http://www.ilustracionmedica.es)

JOSÉ GARCÍA-ARUMÍ,

Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio del Servicio de Oftalmología del Hospital Vall d'Hebron. Catedrático en Oftalmología de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA:

Que JOSEP BADAL LAFULLA licenciado en medicina y cirugía, especialista en oftalmología ha trabajado, bajo mi dirección, habiendo obtenido y estudiado personalmente el material del trabajo titulado:

***“Fracción activa del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) en el tratamiento de la neovascularización coroidea en modelo animal de degeneración macular asociada a la edad”***

Estudio que termina en el día de la fecha con todo aprovechamiento, habiéndolo revisado el que suscribe y estando conforme con su presentación para ser juzgado como tesis doctoral.

Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente en

Barcelona, a 19 de octubre de 2015



MIGUEL ÁNGEL ZAPATA VICTORI,

Doctor en medicina y cirugía. Profesor asociado de oftalmología de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA:

Que JOSEP BADAL LAFULLA licenciado en medicina y cirugía, especialista en oftalmología ha trabajado bajo mi dirección en el transcurso de proyecto de tesis doctoral titulado:

***“Fracción activa del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) en el tratamiento de la neovascularización coroidea en modelo animal de degeneración macular asociada a la edad”***

Habiendo supervisado personalmente el trabajo efectuado así como la redacción y presentación del mismo.

Por lo tanto considero que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el tribunal estipulado, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona

Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente en

Barcelona, a 19 de octubre de 2015





*Als meus pares*



# Agradecimientos

Tengo que manifestar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y instituciones que me han apoyado en el desarrollo del presente trabajo.

En primer lugar al Dr. Miguel Ángel Zapata, por su gran dedicación, su apoyo incondicional y a quien le debo la totalidad de la idea original de este trabajo de investigación científica.

Al Profesor José García-Arumí, por su gran crítica constructiva ayudando siempre a mejorar el nivel científico de esta tesis doctoral.

A todo el equipo del Insitut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron: Anna Salas, Marina Riera, Laura Fontrodona y Dra. Anna Boixadera. Sin su esfuerzo, dedicación y perseverancia de bien seguro que este trabajo no hubiese sido posible.

Al Dr. Antoni Dou, él fue el primero en instruirme y apoyarme en dar los primeros pasos en el mundo del método científico.

A la Societat Catalana d'Oftalmologia, por la beca otorgada en 2010 que ayudó a desarrollar esta línea de investigación.

Finalmente a Vanesa, por su incalculable apoyo y comprensión en todo momento, aguantando noches de ordenador y domingos sacrificados por este trabajo.



# Abreviaturas

<b>AGF</b>	Angiografía fluoresceínica
<b>DMAE</b>	Degeneración macular asociada a la edad
<b>EPR</b>	Epitelio pigmentario de la retina
<b>faPEDF</b>	Fracción activa del <i>pigment epithelium derived factor</i>
<b>fERG</b>	Electrorretinograma focal
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>GFAP</b>	Proteína gliofibrilar ácida
<b>HUVEC</b>	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>MAE</b>	Maculopatía asociada a la edad
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
<b>NVC</b>	Neovascularización coroidea
<b>PEDF</b>	<i>Pigment epithelium derived factor</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet derived growth factor</i>
<b>q-PCR</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>



# Índice

<b>1. Objetivos</b>	<b>1</b>
1.1 Justificación	3
1.2 Hipótesis de trabajo	5
1.3 Objetivos	7
<b>2. Introducción</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Degeneración macular asociada a la edad</b>	<b>11</b>
2.1.1 Definición	11
2.1.2 Epidemiología y factores de riesgo	12
2.1.3 Tipos de DMAE	13
2.1.3.1 DMAE seca o atrófica	14
2.1.3.2 DMAE exudativa	15
2.1.4 Histopatología de la DMAE	19
<b>2.2 Tratamientos para la DMAE</b>	<b>21</b>
2.2.1 Fotocoagulación con láser	22
2.2.2 Terapia fotodinámica con verteporfina	22
2.2.3 Otros tratamientos	23
2.2.4 Fármacos antiangiogénicos	23
2.2.4.1 Pegaptanib sódico	24
2.2.4.2 Ranibizumab	24
2.2.4.3 Bevacizumab	25
2.2.4.4 Aflibercept	26
<b>2.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF)</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Pigment epithelium derived factor (PEDF)</b>	<b>33</b>
2.4.1 Estructura del PEDF	34
2.4.2 Regulación, señalización y función del PEDF	35

2.4.2.1	Función antiangiogénica	35
2.4.2.2	Función antifibrótica	37
2.4.2.3	Función neuroprotectora	37
2.4.2.4	Receptores de PEDF	38
2.4.3	PEDF en patología ocular	39
<b>2.5</b>	<b>Modelos animales de DMAE exudativa</b>	<b>41</b>
2.5.1	Modelo de DMAE exudativa en roedor	42
2.5.1.1	NVC inducida mediante láser	44
2.5.1.2	NVC inducida mediante inyección subretiniana	47
2.5.1.2.1	Inyección subretiniana de Matrigel®	47
2.5.1.2.2	Terapia génica VEGF subretiniana	48
2.5.1.2.3	Inyección subretiniana de macrófagos, hidroperóxido lipídico y polietilenglicol	48
<b>2.6</b>	<b>Administración tópica de fármacos para el segmento posterior</b>	<b>51</b>
2.6.1	Riesgos de las inyecciones intravítreas	52
2.6.2	Obstáculos en la aplicación tópica de fármacos para el segmento posterior	55
2.6.3	Vías de penetración del fármaco hasta el polo posterior	56
2.6.4	Fármacos administrados tópicamente para enfermedades del segmento posterior	58
<b>3.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>Experimentos <i>in vitro</i></b>	<b>63</b>
3.1.1	PEDF sintético	63
3.1.2	Ensayo de migración celular	64
3.1.3	Ensayo de formación de túbulos	65
3.1.4	Ensayo de exclusión con azul tripán	65
<b>3.2</b>	<b>Experimentos <i>in vivo</i></b>	<b>67</b>
3.2.1	Modelo animal de neovascularización coroidea	67
3.2.1.1	Angiografía fluoresceínica	68
3.2.1.2	Electrorretinograma	70
3.2.1.3	Inmunofluorescencia en "flatmount"	72
3.2.1.4	Extracción de RNA de retina y análisis de expresión génica mediante q-PCR	72
3.2.2	Administración tópica del tratamiento	73
3.2.3	Eutanasia	74
3.2.4	Análisis estadístico	75
3.2.5	Aspectos ético-legales	75



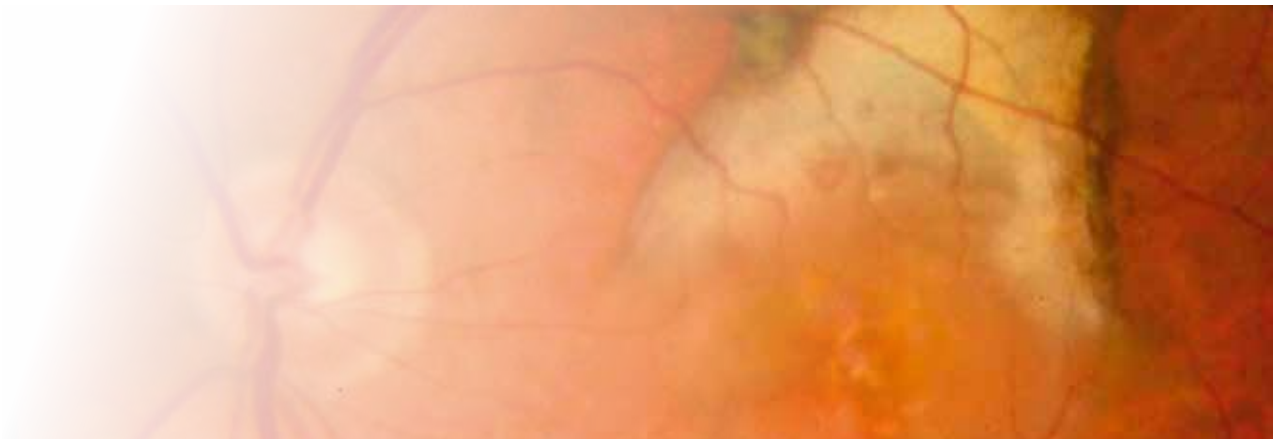
<b>4. Resultados</b>	<b>77</b>
<b>4.1 Experimentos <i>in vitro</i></b>	<b>79</b>
4.1.1 Resultados del ensayo de migración celular	80
4.1.2 Resultados del ensayo de formación de túbulos	82
4.1.3 Resultados del ensayo de exclusión con azul tripán	82
<b>4.2 Experimentos <i>in vivo</i></b>	<b>87</b>
4.2.1 Modelo animal de neovascularización coroidea	87
4.2.1.1 Fotocoagulación mediante láser verde 532 nm	87
4.2.1.2 Angiografía fluoresceínica	88
4.2.1.3 Electrorretinograma focal	90
4.2.1.4 Inmunofluorescencia en <i>flatmount</i>	92
4.2.1.5 Extracción de RNA de retina y análisis de expresión génica mediante q-PCR	93
4.2.2 Administración tópica del tratamiento	94
4.2.2.1 Fotocoagulación mediante láser verde 532 nm	95
4.2.2.2 Angiografía fluoresceínica	95
4.2.2.3 Inmunofluorescencia en <i>flatmount</i>	95
4.2.2.4 Extracción de RNA de retina y análisis de expresión génica mediante q-PCR	102
<b>5. Discusión</b>	<b>105</b>
5.1 Sobre el diseño del ensayo	107
5.2 Modelo animal de DMAE exudativa	109
5.3 Forma de administración farmacológica	111
5.4 Resultados de experimentos <i>in vitro</i>	119
5.5 Resultados de experimentos <i>in vivo</i>	121
5.6 Conclusiones	127
5.7 Bibliografía	129
5.8 Anexo	151



# *Objetivos*

# 1

- 1.1 Justificación
- 1.2 Hipótesis
- 1.3 Objetivos





# 1.1

## Justificación

---

La DMAE es una de las principales causas de ceguera legal en adultos de países desarrollados. Actualmente, todos los tratamientos disponibles para la DMAE exudativa están dirigidos a detener la pérdida de la visión, no habiendo tratamientos que puedan revertir el daño. Los únicos tratamientos de uso autorizados para la DMAE exudativa hasta el año 2005, eran la fotocoagulación con láser y la terapia fotodinámica con verteporfina, siendo este último el tratamiento más utilizado. Sin embargo, estos tratamientos eran apropiados sólo en algunos tipos de pacientes.

La fotocoagulación con láser térmico era únicamente útil en pacientes con lesiones pequeñas extrafoveales, y la terapia fotodinámica con verteporfina estaba principalmente indicada en los pacientes que presentaban los subtipos de DMAE neovascular denominados como clásica y predominantemente clásica. Ambos tratamientos pueden producir efectos adversos. El láser térmico puede dañar el tejido sano de la retina de la zona a tratar, provocando así una disminución de la agudeza visual y un escotoma visual permanente. La terapia fotodinámica con verteporfina se asocia con alteraciones tales como disminución de agudeza visual y alteraciones en el campo visual, además de fotosensibilidad durante los días siguientes a la administración de la verteporfina.

El VEGF juega un papel central en la patogénesis de la neovascularización coroidea. Provoca la neovascularización al estimular la proliferación celular, la permeabilidad vascular, y la inflamación ocular. Los niveles de VEGF raras veces están elevados en pacientes sin neovascularización ocular, sin embargo están aumentados en el epitelio pigmentario de la retina y en los vasos sanguíneos coroideos de la mácula en pacientes con DMAE exudativa. Desde el año 2005, el tratamiento de la neovascularización coroidea secundaria a DMAE ha ido pasando de las

terapias destructivas no selectivas a las destructivas selectivas; entrando en una nueva fase con las terapias inhibitoras anti-VEGF. Actualmente se dispone de tres fármacos de administración intravítrea aprobados para el tratamiento de la neovascularización coroidea secundaria a DMAE: pegaptanib sódico, ranibizumab y aflibercept. Todos ellos tienen diferente mecanismo de acción pero comparten el objetivo final: la disminución de los niveles de VEGF. Estas terapias requieren la administración repetida de inyecciones intravítreas hasta conseguir inactivar el estímulo angiogénico.

La progresión de la DMAE exudativa depende de la disregulación entre factores pro- y anti-angiogénicos, con un aumento de los niveles de VEGF y una disminución de los niveles de PEDF. Desarrollar una terapia no invasiva y eficaz para el tratamiento de la DMAE húmeda basada en una fracción activa de PEDF, permitiría mejorar la seguridad y comodidad de aplicación del tratamiento abriendo una nueva vía terapéutica.

# 1.2

## Hipótesis de trabajo

---

**E**l desequilibrio entre los factores angiogénicos (VEGF) y los factores antiangiogénicos (PEDF) en el ojo es un acontecimiento clave en el desarrollo de la neovascularización coroidea asociada a la DMAE húmeda. Bajo esta premisa, las hipótesis de trabajo son las siguientes:

1. El tratamiento con PEDF puede ser la mejor opción terapéutica para la DMAE, no sólo inhibiendo la neovascularización coroidea inducida por el VEGF, sino también ejerciendo una acción antiinflamatoria, neurotrófica y protectora en el epitelio pigmentario de la retina.
2. La administración tópica de una faPEDF, por tener menor tamaño, puede penetrar la córnea y ser efectiva en la parte posterior del ojo, ofreciendo una forma de administración no invasiva.
3. La faPEDF puede mantener la capacidad antiangiogénica, neurotrófica y antiinflamatoria del péptido entero.





# 1.3

## Objetivos

---

**E**l objetivo principal de este proyecto es evaluar la eficacia de la administración de una faPEDF sintética por vía tópica con el fin de determinar una nueva vía terapéutica para la NVC secundaria a DMAE.

Los objetivos específicos de cada fase del trabajo son:

1. Fase *in vitro*:

Determinar *in vitro* el efecto antiangiogénico de las diferentes faPEDF mediante ensayos de migración celular, formación tubular y proliferación celular en cultivos primarios de células endoteliales.

2. Fase *in vivo*:

2.1 Desarrollar y optimizar un modelo animal de NVC efectivo y eficiente en ratones C57BL/6N como modelo plausible de NVC asociada a DMAE.

2.2 Valorar el efecto de la administración tópica de la faPEDF en el control de las lesiones neovasculares en el modelo animal de ratón C57BL/6N.

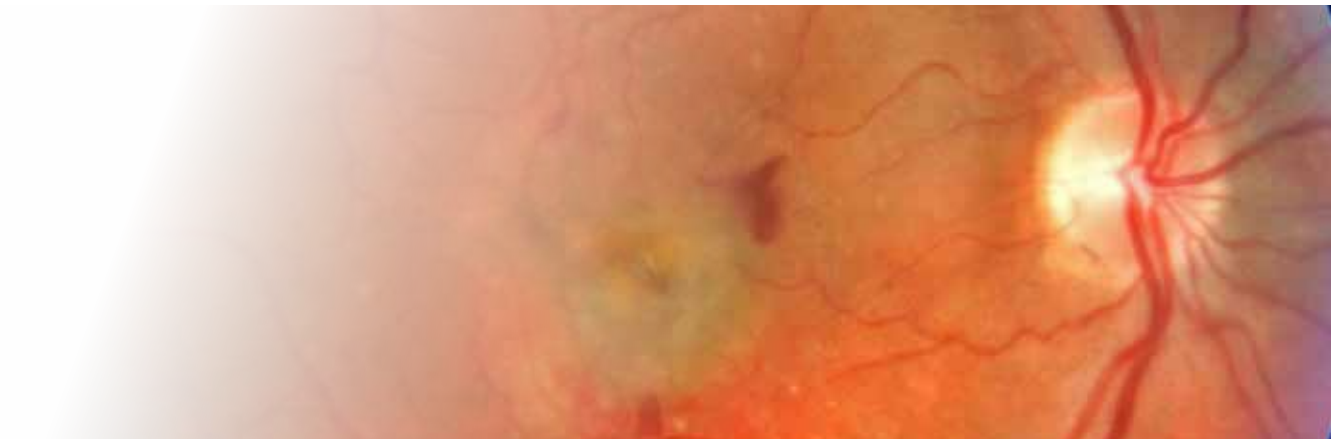
2.3 Evaluar los efectos antiinflamatorios, antiangiogénicos y neurotróficos en la retina de ratón C57BL/6N tratada con la faPEDF.



# *Introducción*

## 2

- 2.1 Degeneración macular asociada a la edad
- 2.2 Tratamientos de la DMAE
- 2.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF)
- 2.4 Pigment epithelium derived factor (PEDF)
- 2.5 Modelos animales de DMAE exudativa
- 2.6 Administración tópica de fármacos para el segmento posterior





# 2.1

## Introducción Degeneración macular asociada a la edad

---

### 2.1.1 Definición

La DMAE es una de las principales causas de ceguera legal en adultos de países desarrollados, siendo la principal causa de ceguera en personas de más de 65 años.<sup>1</sup> La DMAE afecta a la mácula, región central de la retina que contiene la mayor densidad de fotorreceptores y es responsable de generar la alta resolución visual central. Una de las principales características de la DMAE es la aparición de drusas coroides, depósitos de detritos celulares localizados entre el EPR y la membrana de Bruch. Éstas representan el primer signo clínico de la patología. En individuos mayores de 50 años pueden aparecer pocas drusas pequeñas que no tengan relación con la maculopatía asociada a la edad, pero el exceso en número y/o aparición de drusas medianas o grandes pueden llevar a la destrucción del EPR que, en combinación con procesos inflamatorios, causa atrofia de la retina y disminución moderada en la agudeza visual.

La presencia de drusas y, en consecuencia, atrofia de la mácula, caracteriza la DMAE seca o no exudativa. Ésta puede progresar a DMAE húmeda o exudativa si aparecen membranas neovasculares subretinianas, normalmente de origen coroidal, produciendo exudación de fluido, hemorragia, edema macular y, en estadios finales, muerte de los fotorreceptores y fibrosis subretiniana. Todo este proceso conlleva una pérdida permanente y considerable de la agudeza visual central de estos pacientes.<sup>2</sup> Los síntomas iniciales de esta patología son: disminución de la agudeza visual central, escotoma central (un punto ciego en el campo visual) y metamorfopsia (distorsión de la imagen). Es una patología con tendencia a la bilateralidad, aunque el grado de afectación de cada ojo puede ser asimétrico.

## 2.1.2 Epidemiología y factores de riesgo

Debido a la comorbilidad que genera esta enfermedad, los pacientes presentan grandes limitaciones que afectan de forma significativa su calidad de vida. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en las próximas décadas la DMAE triplicará su prevalencia como consecuencia del incremento de longevidad de las sociedades industrializadas. El grado de incapacidad de los individuos afectados será uno de los problemas sociosanitarios más importantes.<sup>3,4</sup> Es la principal causa de ceguera legal (agudeza visual inferior a 20/200) en los sujetos adultos de origen europeo.<sup>3,5-9</sup> Si bien suele aparecer entre los 50 y 65 años, su prevalencia aumenta de manera exponencial a partir de los 70 años. La prevalencia global de DMAE se estima en un 1% para las personas entre 65 y 74 años de edad, un 5% para aquellos entre 75 y 84 años de edad, y un 13% para el grupo mayor de 85 años.<sup>9</sup>

En Estados Unidos, se han realizado diferentes estudios.<sup>3,6,9,10</sup> Estimaron que el número de individuos con DMAE en el año 2005 fue de aproximadamente de 1,75 millones, y que esta cifra aumentará en al menos un 50% para el año 2020, correspondiendo a 2,95 millones de afectados. Aplicando los mismos criterios, se estima que en Europa occidental actualmente existen 3,5 millones de personas con DMAE, y en 2020 serán 4,8 millones.<sup>11</sup> La mayoría de autores cuando hablan de DMAE se refieren a la presencia de formas neovasculares o formas atróficas avanzadas (atrofia geográfica), pero algunos otros consideran como DMAE la simple presencia de drusas.

En España, la escasa información epidemiológica disponible proviene de los datos de afiliación de la Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE). Pero en ellos no se contempla la DMAE de forma aislada, sino dentro de las maculopatías (11,5% sobre el total de afiliados y un 25,5% sobre el total de altas en el año 2010). Según la pirámide poblacional española, las estimaciones son que en 2015, 400.000 pacientes sufrirán DMAE y más de un millón de personas puede considerarse población de riesgo.<sup>12</sup> Muchos son los factores que se han relacionado como causa de esta enfermedad. De todos ellos, la edad constituye el de primera magnitud.<sup>3-10</sup>

Si bien, aunque esta relación es estrecha, no es en absoluto sinónimo de que el envejecimiento sea su única causa. El tabaquismo se ha relacionado con esta patología como consecuencia del incremento del estrés oxidativo derivado de su consumo. Su efecto parece ser dosis dependiente.<sup>13</sup> Se entiende por estrés oxidativo al daño celular causado por distintos radicales libres derivados del metabolismo del oxígeno molecular, entre los que cabe destacar a los singletes de oxígeno y el peróxido de hidrógeno.<sup>14</sup> La retina es particularmente susceptible al estrés oxidativo por una serie de motivos: 1) su consumo de oxígeno es muy alto generando gran

cantidad de radicales libres en el ámbito retiniano; 2) recibe importantes cantidades de irradiación lumínica de distintas longitudes de onda; 3) las membranas de los segmentos externos de los fotorreceptores contienen numerosos ácidos grasos poliinsaturados, susceptibles a fenómenos de peroxidación lipídica que generan gran cantidad de radicales libres; y 4) contiene muchos grupos cromóforos, entre ellos rodopsina y lipofuscina, que mediante la absorción de la luz pasan a un estado excitado, lo que acaba provocando un importante daño tisular a causa de una reacción fotoquímica en la que se forman radicales libres.<sup>15</sup>

El exceso de exposición lumínica<sup>16,17,18</sup> también podría favorecer la aparición de DMAE por el incremento de estrés oxidativo que ejerce sobre la retina. La cirugía de cataratas, puede favorecer el desarrollo de DMAE en ojos predispuestos.<sup>19</sup> Se ha postulado que el cristalino opaco bloquea la radiación ultravioleta y así evita que llegue a dañar la retina pero tras la cirugía se liberarían mediadores inflamatorios que harían progresar la DMAE. La DMAE es una patología multifactorial donde varios factores de riesgo y variantes genéticas actúan en conjunto en el desarrollo de la enfermedad. Los factores genéticos relacionados con la susceptibilidad de la DMAE incluyen el polimorfismo Tyr420His en el gen del factor del complemento H (CFH), así como el polimorfismo Ala69Ser en el gen 2 de sensibilidad a maculopatía asociada a la edad (ARMS2).<sup>20,21</sup>

Hay otras evidencias de la implicación del sistema inmunológico en el desarrollo de la DMAE.<sup>22</sup> Investigaciones clínicas han demostrado que las drusas actúan como estímulo antigénico, están asociadas con el reclutamiento de macrófagos en la membrana de Bruch y coroides y alteran el fenotipo de los macrófagos residentes en la coroides.<sup>23</sup> El desarrollo de grandes drusas y la apoptosis del EPR son señales de la respuesta inmune y estos constituyen un factor que determina el riesgo de progresión a DMAE avanzada.<sup>24</sup> El mecanismo que lleva al desarrollo de las lesiones de DMAE temprana y tardía aún es desconocido. Se sabe que el proceso de desarrollo de la DMAE es semejante al de otras patologías degenerativas del envejecimiento pero las características inmunológicas específicas del medio intraocular son las responsables de la forma de presentación de esta patología ocular. El privilegio inmune fisiológico intraocular inhibe la respuesta inflamatoria y retrasa el desarrollo de la DMAE avanzada, pero, debido a factores genéticos o externos, la cascada inflamatoria, NVC y apoptosis son activadas en algunos pacientes.<sup>24</sup>

### 2.1.3 Tipos de DMAE

Existen esencialmente dos tipos de DMAE, la forma atrófica o seca y la forma exudativo-hemorrágica o húmeda. La forma exudativa es la menos prevalente pero es responsable del mayor número de casos de pérdida severa de agudeza visual. Entre

un 10% y un 20% de las DMAE atróficas evolucionan hacia formas exudativo-hemorrágicas en un plazo de 5 años.<sup>25,26</sup>

### 2.1.3.1 DMAE seca o atrófica

Maculopatía asociada a la edad (MAE) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE), en su forma atrófica o seca, son conceptos que se han manejado indistintamente en la práctica clínica. La MAE incluye los signos relacionados con cambios maculares asociados a la edad, con o sin afectación de la agudeza visual: drusas, cambios pigmentarios y hallazgos característicos de DMAE. El concepto de DMAE incluye la pérdida visual como consecuencia de drusas, atrofia geográfica del epitelio pigmentario (forma seca o atrófica) o neovascularización coroidea (forma húmeda o exudativo-hemorrágica).<sup>25</sup>

Las drusas se consideran indicadores primarios de los cambios que relacionados con la edad se suceden en la membrana de Bruch. Implican riesgo de la pérdida visual secundaria al desarrollo de neovascularización coroidea, desprendimientos del epitelio pigmentario o atrofia geográfica. Su aparición se asocia a una cierta predisposición genética pero se considera que son primordialmente adquiridas.<sup>27</sup>

Oftalmoscópicamente se manifiestan como depósitos subepiteliales de color blanco amarillento distribuidos de manera asimétrica en el fondo de ojo. Su tamaño es muy variable. Son asintomáticas clínicamente salvo que se asocien a una lesión macular, en cuyo caso pueden cursar con disminución de la agudeza visual y metamorfopsias.

Dependiendo de su aspecto clínico, características angiográficas y relevancia clínica se clasifican en cinco tipos: duras, blandas, mixtas, laminares, basales y calcificadas.<sup>25</sup>

Los cambios pigmentarios se corresponden con áreas de hipo o hiperpigmentación localizadas en capas profundas de la retina o incluso en la coroides. A medida que progresan estas lesiones se van formando placas de atrofia alrededor de la fovea que posteriormente pueden evolucionar hacia áreas de atrofia geográfica.

A medida que se suceden los cambios pigmentarios las áreas atrofiadas van aumentando en tamaño y en ocasiones en número. Cuando estas áreas confluyen dan lugar a placas de atrofia uniformes, de contornos irregulares y muy bien definidos, los cuales permiten diferenciar con precisión los límites entre la retina sana y la atrófica. Los estudios histopatológicos demuestran que en estas áreas de atrofia geográfica existe una destrucción neurosensorial de la retina, del epitelio pigmentario y, con relativa frecuencia de la capa coriocapilar subyacente.



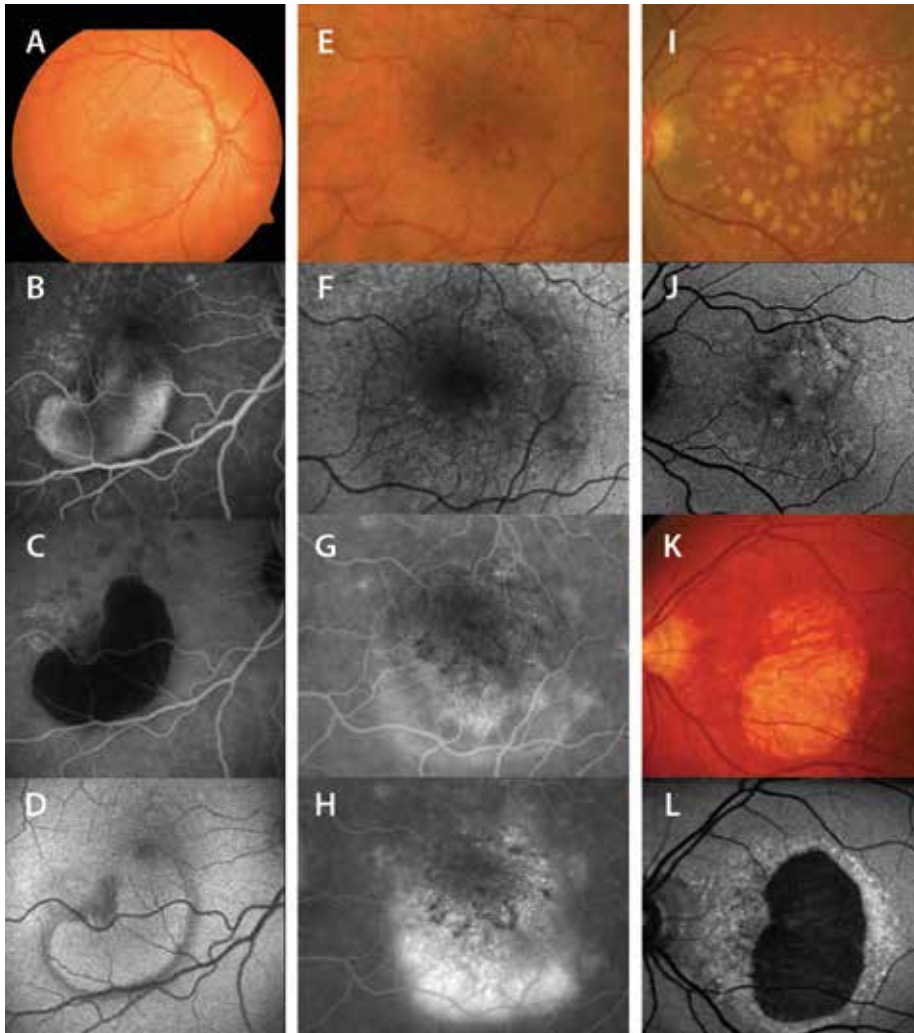
En 1995 el grupo epidemiológico internacional de la MAE propuso una clasificación a fin de unificar los criterios de diagnóstico y progresión de la MAE: MAE incipiente o bien MAE avanzada (incluye DMAE atrófica o atrofia geográfica).

No hay un tratamiento adecuado que evite el riesgo de progresión de una MAE. Es importante controlar adecuadamente los factores susceptibles de aumentar el riesgo. En 2001 se presentaron los primeros resultados de un importante estudio multicéntrico (AREDS) en donde se describe que los suplementos con vitaminas, betacarotenos y cinc podrían disminuir el riesgo de evolución a formas más graves de DMAE, especialmente en pacientes que ya presentan una afectación severa en un ojo.<sup>28</sup> Nuevas conclusiones del estudio AREDS no encuentran relación entre la aportación de suplementos de luteína con la disminución del riesgo de presentar formas avanzadas de DMAE.<sup>29</sup> Aun así, parece recomendable el aconsejar un aporte suplementario de antioxidantes y micronutrientes, ya que aparentemente tales suplementos disminuyen el riesgo de progresión de MAE incipiente hacia formas de DMAE atróficas o exudativo-hemorrágicas.

### 2.1.3.2 DMAE exudativa

La DMAE de tipo exudativo (llamada húmeda o neovascular), corresponde a una forma avanzada de DMAE (figura 1). Se produce una neovascularización coroidea debido a un crecimiento interno de capilares coroides a través de la cara externa de la membrana de Bruch. Los vasos crecen a través de la membrana de Bruch, se expanden en dirección horizontal entre la cara interna de dicha membrana y el epitelio pigmentario de la retina (neovascularización coroidea oculta). Del crecimiento de los neovasos a través de la capa de células del epitelio pigmentario resulta la formación de una neovascularización coroidea clásica. Este crecimiento vascular causa una alteración fisiológica marcada en el área macular con una disfunción de la retina neurosensorial. En este proceso están implicados diferentes mecanismos, como pueden ser la hiperpermeabilidad vascular y hemorragias. Durante el curso de la enfermedad se reduce el componente vascular de la lesión, se incrementa el de tejido fibroso, lo que produce una cicatriz disciforme en el último estadio de la enfermedad.<sup>30</sup>

La evolución natural de la enfermedad está caracterizada por una importante pérdida de agudeza visual. La agudeza visual se define como la capacidad para observar un detalle en condiciones de máximo contraste. En cambio, la facultad para distinguir patrones en condiciones de bajo contraste se denomina sensibilidad al contraste, esta cualidad ha demostrado ser un buen predictivo de la velocidad de lectura, la movilidad de los pacientes y la habilidad para reconocer elementos tales como señales de tráfico. Las actividades que implican una discriminación visual, como el reconocer la cara de una persona, se relacionan más con la sensibi-



**Figura 1.** Diferentes formas de DMAE. Desprendimiento seroso del EPR mediante retinografía (A), AGF (B), ICG (C) y FAF (D). NVC asociada a DMAE exudativa mediante retinografía (E), FAF (F), AGF temprana (G), AGF tardía (H). Drusas blandas y atrofia geográfica mediante retinografía (I, K) y FAF (J,L).

lidad al contraste que con la agudeza visual. En la DMAE exudativa los neovasos coroideos pueden formar una membrana neovascular entre la membrana de Bruch y el epitelio pigmentario de la retina o bien entre el epitelio pigmentario y la retina neurosensorial.

Los neovasos coroideos formados podrán producir una exudación que degenera en edema subretiniano y/o intrarretiniano. Si los neovasos sangran, observaremos la presencia de hemorragias subretinianas (cuando éstas son extensas pueden originar un desprendimiento hemorrágico de la retina) o de hemorragias intrarretinianas y,

si traspasa la membrana limitante interna, hemorragias prerretinianas, pudiendo incluso penetrar hasta el vítreo, produciendo un hemovítreo.

Debido a la ocupación del espacio retiniano por nuevos vasos es frecuente la presencia de un desprendimiento de EPR, que consiste en una acumulación anormal de líquido entre el EPR y la membrana de Bruch, casi siempre en la zona de la mácula. A veces esto se asocia a una acumulación de líquido intrarretiniano o subretiniano. Una hipótesis sobre el origen de esta acumulación de líquido intrarretiniano o subretiniano, expone que es debido a que las células del epitelio no consiguen bombearlo a través de la membrana hidrófoba de Bruch, lo que explicaría los desprendimientos de epitelio sin neovascularización.<sup>30</sup> Existen datos en los que hasta un 67% de los desprendimientos del epitelio pigmentario de la retina desarrollan una neovascularización en el plazo de un año.<sup>30</sup>

En función del tipo de NVC y de su localización podremos dividir las en varios grupos. Según la localización de la NVC con respecto a la fovea<sup>31</sup> se pueden definir como NVC subfoveal (ubicada en el centro de la fovea), yuxtafoveal (localizada a una distancia entre 1 y 200  $\mu\text{m}$  del centro de la fovea), extrafoveal (a más de 200  $\mu\text{m}$  del centro de la fovea) y yuxtapapilares (adyacentes al disco óptico).

Desde el punto de vista angiográfico la lesión se puede clasificar en<sup>31</sup> NVC clásica (membranas con patrón en rueda de carro, bien definida y cuya extensión es mayor del 50% del tamaño de la lesión), oculta (mal definida, no se aprecia el patrón típico en rueda de carro. Se observa un patrón de hiperfluorescencia tardía de origen indeterminado o como desprendimiento fibrovascular del EPR) o bien mixta (combinación de ambas).

La llamada Proliferación Angiomatosa Retiniana (RAP) podría estar producida por un mecanismo similar a la NVC. Parece desarrollarse en el marco de una MAE temprana, y en ella los vasos sanguíneos retinianos invaden la retina externa, manifestación que puede preceder o darse de forma simultánea a la NVC.<sup>32</sup> Esta patología ha sido identificada como una forma peculiar de DMAE neovascular donde los nuevos vasos parten de la retina neurosensorial y se dirigen hacia las capas externas de la misma, anastomosándose ocasionalmente con la circulación coroidea. La presencia de hemorragias intrarretinianas, telangiectasias y microaneurismas puede ayudar al diagnóstico de esta entidad, especialmente en el estadio final. La Proliferación Angiomatosa Retiniana en su inicio se sucede como una proliferación de capilares dentro de la retina, extendiéndose posteriormente al espacio subretiniano para terminar finalmente en una franca NVC.

Finalmente, la NVC puede entrar en un estado de inactividad dejando a su paso una cicatriz. El grado de cicatrización es variable: depende de la extensión de la lesión, de la sangre subepitelial y del estado del epitelio pigmentario, entre otros

factores. El tamaño y la localización de la cicatriz disciforme condicionarán la agudeza visual del paciente afectado.

Uno de los factores clave en la progresión de la DMAE es la angiogénesis ocular. Ésta está controlada por el equilibrio entre los factores que estimulan y los que inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos. Entre los principales factores estimuladores de neovasos encontramos el factor de crecimiento de endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Originalmente el VEGF fue descrito como un factor endotelial angiogénico y promotor de la permeabilidad vascular. Se ha demostrado que, en respuesta al VEGF, se da una pérdida de líquido por los vasos de la retina, generando acúmulo de líquido y edema macular.<sup>33</sup> Además, la liberación de VEGF también afecta la función del EPR.<sup>34,35</sup> Hay una gran evidencia clínica de que la expresión de VEGF está aumentada en las membranas de NVC extraídas quirúrgicamente de pacientes con DMAE.<sup>36,37</sup> Ojos con DMAE temprana también presentan aumento en la expresión de VEGF en el EPR y pacientes con NVC presentan aumento de VEGF en el vítreo.

En contraste, el principal factor antiangiogénico expresado en el ojo, el factor derivado de epitelio pigmentario (*pigment epithelium derived factor*, PEDF) se encuentra disminuido en esta patología. Se ha observado disminución en la expresión en pacientes con DMAE<sup>38</sup> y disminución de la concentración en el vítreo de pacientes con NVC.<sup>39</sup> Esta desregulación en el equilibrio entre VEGF y PEDF es la principal responsable de la formación de nuevos vasos sanguíneos aberrantes durante el desarrollo de la DMAE.<sup>40,41</sup> Un estudio reciente ha demostrado que la transición de la DMAE de seca a húmeda se da cuando la capacidad del PEDF de regular la proteólisis del receptor 2 del VEGF es reducida, generando una desregulación de la señal del VEGF en el EPR.<sup>41</sup>

Hay evidencias de que la latencia en la división de las células endoteliales y las funciones de barrera endoteliales en el ojo también son reguladas por el balance entre VEGF y PEDF.<sup>42</sup> En las células endoteliales, el PEDF compite con el VEGF por el receptor VEGFR2,<sup>43</sup> también regula la expresión de VEGF<sup>44,45</sup> y disminuye la fosforilación del receptor de VEGF.<sup>46</sup> Un estudio realizado con endotelio demostró que el mecanismo inhibitorio del VEGF vía PEDF es inducido por la proteólisis intermembrana del receptor VEGF-R1 por la gamma-secretasa.<sup>44</sup>

Además del VEGF y el PEDF, estudios recientes indican que las angiopoyetinas 1 y 2 y su receptor Tie-2 contribuyen en la formación de la NVC. La angiopoyetina 1 funciona como agonista, y promueve la integridad vascular y la maduración, inhibe la apoptosis y reduce la permeabilidad. La angiopoyetina 2 es un antagonista de la angiopoyetina 1, y promueve la angiogénesis inducida por el VEGF. Se ha demostrado que el receptor Tie-2 y las angiopoyetinas 1 y 2 están presentes en el tejido de la NVC.<sup>47</sup> Además hay receptores específicos para el endotelio ac-

tivo de las membranas de la NVC, como las  $\alpha$ -integrinas y el receptor CD105 del factor transformador del crecimiento beta (TGF- $\beta$ ). Estos receptores pueden representar un objetivo potencial para futuros tratamientos antiangiogénicos. En un modelo de NVC se pudo inhibir el crecimiento vascular añadiendo anticuerpos monoclonales contra las  $\alpha$ -integrinas.<sup>48</sup> El bloqueo del receptor CD105 del factor transformador del crecimiento beta se asocia a la inhibición de la proliferación endotelial.<sup>49</sup>

Sobre estos hechos, se ha desarrollado la hipótesis de que la naturaleza no vascular de la membrana de Bruch se debe a que el EPR inhibe el crecimiento hacia el interior de los vasos sanguíneos coroideos, y que esta inhibición varía en respuesta a los cambios asociados a la edad.

Se desconoce cuál es el estímulo para modificar la producción del factor de crecimiento del EPR, se presume que pueda ser debido bien a una deficiencia en el aporte metabólico desde el plasma debido por una menor difusión de sustancias a través de la membrana de Bruch engrosada, o bien a un menor aporte de oxígeno como resultado de los cambios en los capilares coroideos.<sup>50</sup>

#### 2.1.4 Histopatología de la DMAE

Desde un punto de vista histológico en la DMAE ocurren ciertos cambios anatomopatológicos.

Los cambios más importantes en la retina neurosensorial debidos a la edad se producen en la células de Müller y en los axones de las células ganglionares: hipertrofia, acumulación de lípidos o disminución y sustitución por tejido conectivo.<sup>51</sup> Mientras que los bastones desaparecen con el envejecimiento, incluso sin enfermedad manifiesta del epitelio pigmentario, los conos empiezan a degenerar únicamente en las fases avanzadas de DMAE no exudativa.<sup>52,53</sup> La mayor pérdida de células fotorreceptoras se localiza en el área parafoveal y en presencia de atrofia geográfica o degeneración disciforme, y puede, finalmente, dar como resultado la desaparición de todos los fotorreceptores. A nivel del EPR, ya en fases tempranas se puede observar una disminución de su número y densidad a nivel de la retina central.

La membrana de Bruch va engrosándose progresivamente durante el envejecimiento, por acumulación de desechos membranosos lipídicos y de componentes anormales de matriz extracelular, sobretodo las capas de colágeno interno. La acumulación de material en la capa colágena interna, protruyendo hacia la retina, es lo que precisamente se conoce con el término de drusas.<sup>53</sup>



# 2.2

## Introducción Tratamientos para la DMAE

---

**T**odos los tratamientos disponibles hasta la actualidad están encaminados a frenar la progresión de la enfermedad cuando esta se encuentra en su fase exudativa. No existe tratamiento curativo para ninguna de las fases de la enfermedad. Al inicio de esta patología se produce una penetración de los vasos sanguíneos en la membrana de Bruch desde la coroides, por lo que numerosos tratamientos se han dirigido a suprimir los vasos sanguíneos. Hasta hace poco tiempo estos tratamientos consistían en medios físicos, como el calor por fotocoagulación, la generación de radicales libres por radiación ionizante o terapia fotodinámica mediante colorantes fotosensibilizantes, esperando poder destruir los nuevos vasos sin dañar el epitelio pigmentario de la retina, del cual depende la supervivencia de las células fotorreceptoras y, por tanto, la preservación de la visión.

Los pacientes con NVC que no reciben ningún tratamiento tienen un mal pronóstico. Un 62% de los ojos con NVC extrafoveal y un 65% de los ojos con NVC yuxtafoveal sufren una pérdida grave de visión. Entre los ojos con NVC subfoveal aquellos con una buena visión inicial presentan una probabilidad de entre 55 y 65% de sufrir una pérdida visual grave.<sup>54</sup> Los datos del *Macular Photocoagulation Study*<sup>1</sup> concluyen que la fotocoagulación no está indicada en la mayoría de los casos con NVC macular. Otra alternativa terapéutica es la terapia fotodinámica con verteporfina, aunque la mayoría de los pacientes no experimenta mejoría visual.<sup>55</sup> Así pues, los fármacos antiangiogénicos administrados de forma intravítrea, se han convertido en la primera opción terapéutica para la DMAE neovascular.<sup>31,56</sup>

## 2.2.1 Fotocoagulación con láser

El ensayo clínico realizado por el *Macular Photocoagulation Study* estudió en los años 80 y 90 el empleo de la fotocoagulación con láser en la NVC, basándose en el efecto térmico del láser que induce el cierre de la estructura neovascular. En este estudio se le dio gran relevancia a la localización de la lesión respecto a la fovea y a la composición de la misma. En este sentido, lesiones alejadas de la fovea, con predominio del componente clásico eran susceptibles de los mejores resultados, aunque también se trataron lesiones subfoveales buscando un escotoma menos extenso del que produciría la evolución natural. Las principales complicaciones de la fotocoagulación con láser son: la aparición de un escotoma irreversible como consecuencia del daño directo de la retina neurosensorial por la acción térmica del propio láser, especialmente grave en NVC subfoveal y, la elevada incidencia de recidiva de la actividad neovascular semanas después de la aplicación del tratamiento, con el consecuente deterioro visual asociado y el crecimiento de la cicatriz meses después de la administración del tratamiento. En la actualidad, es posible tratar con láser lesiones clásicas bien delimitadas de localización extrafoveal. En el caso de lesiones yuxtafoveales, numerosos autores prefieren el empleo de antiangiogénicos por el riesgo de pérdida visual asociada a la recidiva tras el tratamiento con láser. También se puede considerar la fotocoagulación con láser en el tratamiento de lesiones peripapilares y en la vasculopatía coroidea polipoidea y en la proliferación angiomasiosa retiniana.

## 2.2.2 Terapia fotodinámica con verteporfina

La terapia fotodinámica es una modalidad de tratamiento en la que se inyecta, en primer lugar, un colorante fotosensible, verteporfina (Visudyne®, Novartis, Basilea, Suiza) por vía intravenosa, que, en una segunda fase, es activado en el tejido neovascular por la acción de un láser cuya longitud de onda coincide con el pico de absorción del producto.<sup>57</sup> La activación selectiva del fármaco en el tejido neovascular induce un daño selectivo de dicho tejido, ocasionando la oclusión de la estructura neovascular en una reacción mediada por la liberación de radicales libres.

Los ensayos pivotaes con terapia fotodinámica demostraron que ésta reducía el riesgo de pérdida visual moderada y severa en NVC predominantemente clásica<sup>58</sup> y tenía un efecto beneficioso respecto al grupo control en NVC oculta, con progresión reciente y tamaño pequeño o agudeza visual inferior a 20/50<sup>59</sup>. A pesar de ello, el cambio medio en la agudeza visual ha sido de una ligera pérdida de visión y el porcentaje de pacientes que mejoran la agudeza visual con terapia fotodinámica es escaso, por lo que ha sido desplazada por los antiangiogénicos como tratamiento de primera línea en la NVC.<sup>59</sup> Por dicho motivo, hoy se considera la utilización



de terapia fotodinámica en caso de no poder emplear los antiangiogénicos o en asociación a los mismos.

### 2.2.3 Otros tratamientos

La cirugía de la extirpación de la NVC ha caído progresivamente en desuso conforme han mejorado los resultados del tratamiento intravítreo, por presentar numerosas complicaciones y unos resultados poco reproducibles. En la actualidad, se mantiene la indicación quirúrgica en caso de hemorragia submacular masiva y en algunas membranas yuxtapapilares cuya extensión no afecta a la zona avascular foveal.

La termoterapia transpupilar es una variante de fotocoagulación de baja radiancia en la retina, lo que se asocia a un menor daño tisular local y permite el tratamiento del área subfoveal. Se han publicado diversos ensayos clínicos y series de casos de pacientes con NVC tratados con termoterapia transpupilar; aunque los primeros resultados fueron esperanzadores, no han demostrado una mejoría significativa sobre otras variantes terapéuticas.<sup>60</sup>

### 2.2.4 Fármacos antiangiogénicos

Los avances de la última década en tratamientos oncológicos con moléculas antiangiogénicas han facilitado el desarrollo de líneas de investigación con resultados significativos en el tratamiento de la DMAE exudativa.

Michelson (1948) describió el denominado “factor X”, producido en la retina en respuesta a agresiones externas de tipo infeccioso e inflamatorio. Posteriormente, Folkman (1972) descubrió el factor antiangiogénico, y Kohler y Miltein (1975) desarrollaron anticuerpos monoclonales. En 1989, Napoleone Ferrara clonó y purificó el factor de crecimiento vascular endotelial, este hecho junto con la humanización de los anticuerpos y el conocimiento histopatológico de la DMAE, sentó las bases del tratamiento antiangiogénico.<sup>61</sup> Como ya hemos visto los cambios relacionados con la edad que estimulan la neovascularización patológica en el área macular son procesos complejos todavía no bien conocidos. La NVC es el paradigma de la DMAE exudativa,<sup>62</sup> producida principalmente por el VEGF como respuesta a la isquemia o a otros factores.<sup>63</sup>

El factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A), citocina soluble que favorece la angiogénesis y aumenta la permeabilidad vascular, desempeña un importante papel en la formación de neovasos. De todas las isoformas biológicamente activas de VEGF-A,<sup>58</sup> dos de ellas parecen estar implicadas en la aparición de lesiones NVC secundarias a la DMAE.<sup>64</sup> Todo ello ha permitido la investigación de distintos fármacos dirigidos contra el VEGF, con aplicación directa en el tratamiento

de la DMAE exudativa. Hasta el momento actual, encontramos cuatro moléculas específicas disponibles en el mercado para el tratamiento de la DMAE exudativa: pegaptanib, un aptámero que bloquea de manera selectiva la isoforma 165 del VEGF-A, ranibizumab, un fragmento de un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado, con buena penetración al espacio coroideo y capaz de bloquear todas las isoformas del VEGF-A, bevacizumab, que es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 y capaz de inhibir todas las isoformas biológicamente activas del VEGF-A y finalmente aflibercept es una proteína de fusión que actúa compitiendo con el VEGF por la fijación a su receptor, compitiendo con las isoformas de VEGF-A y el factor de crecimiento placentario. La eficacia y seguridad de estos fármacos han sido probadas en múltiples estudios.

#### 2.2.4.1 Pegaptanib sódico

Fue el primer fármaco anti-VEGF que obtuvo la indicación para el tratamiento de la DMAE neovascular. Aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) el 20 de diciembre de 2004 y posteriormente por la European Medicines Agency el 31 de enero de 2006. La molécula fue desarrollada por Eyetech (Nueva York, Estado Unidos) y comercializada en todo el mundo por Pfizer. Se trata de un conjugado covalente de un oligonucleótido de ARN de 28 bases unidas a dos cadenas de polietilenglicol ramificadas de 20 kDa de peso molecular que favorecen su efectividad al prolongar su semivida. Es una proteína de tipo aptámero que se une específicamente a la isoforma 165 del VEGF, bloqueándolo, impidiendo su interacción con los receptores de superficie de las células endoteliales.<sup>65</sup> Su peso molecular es de 50 kDa y su osmolaridad, de 280 a 360 mOsm/kg, con pH de 6,7.

Al ser una molécula aptámera, tiene una elevada afinidad y selectividad, y no es inmunogénica ni tóxica. En el Estudio VISION<sup>66</sup> realizado en 1.186 pacientes, el 70% de los pacientes tratados con el fármaco perdieron menos de 15 letras de agudeza visual en el test ETDRS de visión (*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*), comparado con el 55% del grupo control, a las 54 semanas. Una vez penetra en el humor vítreo, es degradado enzimáticamente por las nucleasas intraoculares, las fracciones glucídicas aumentan su semivida y actúan selectivamente frente al VEGF1,<sup>65</sup> evitando la unión de éste con sus receptores VEGFR 1 y 2.<sup>62</sup> Su semivida es de 8 a 14 días consiguiendo una dosis plasmática de 80 µg/mL, y se elimina por orina. No suele presentar otros efectos adversos que los asociados a la administración intravítrea.<sup>67</sup>

#### 2.2.4.2 Ranibizumab

Fármaco sintetizado por Genentech (San Francisco, California, Estados Unidos) y comercializado fuera de Estados Unidos por Novartis. Aprobado por la FDA el

30 de junio de 2006 y por la European Medicines Agency el 22 de enero de 2007 para la indicación exclusiva en DMAE húmeda. El ranibizumab (Ru-Fab V2) es un fragmento del anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-VEGF con un peso molecular de 48 kDa (el anticuerpo entero tiene 148 kDa), que permite una mayor penetración retiniana pudiendo actuar en enfermedades que afectan a las capas externas de la retina y la coroides. Bloquea todas las isoformas del VEGF factor A (VEGF-A) implicadas en el proceso de neovascularización (angiogénesis). Tiene una afinidad 5-10 veces más alta que otros antiangiogénicos como el bevacizumab.

Una vez inyectado en la cavidad vítrea se une a isoformas de VEGF-A, generadas por corte y empalme alternativo del ARN, VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub>, así como al producto biológicamente activo derivado de la escisión proteolítica de dichas isoformas, el VEGF<sub>110</sub>. La unión del ranibizumab al VEGF-A impide la interacción de este último con sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 en la superficie de las células endoteliales. La unión del VEGF y el tamaño relativamente menor del fragmento Fab con respecto al del anticuerpo íntegro facilita la penetración de la molécula en la retina.

En los estudios Marina<sup>68</sup> y Anchor,<sup>69,70</sup> el 96% de los pacientes tratados con inyecciones mensuales de 0,5 mg de ranibizumab perdió menos de 15 letras ETDRS de agudeza visual y al menos el 33% ganó más de 15. Aunque los mejores resultados del tratamiento se han obtenido con inyecciones aplicadas cada mes durante 2 años. Después de la administración intravítrea, las concentraciones séricas de ranibizumab son generalmente bajas. La concentración máxima suele ser inferior a la concentración necesaria para inhibir la actividad biológica de VEGF un 50% (11-27 ng/mL, determinado en un ensayo de proliferación celular *in vitro*). La concentración máxima fue proporcional a la dosis en el intervalo de dosis de 0,05 a 1,0 mg/ojo. Los análisis de farmacocinética poblacional y la desaparición de ranibizumab del suero en los pacientes tratados con la dosis de 0,3 mg indican que la semivida de eliminación vítrea de ranibizumab es de unos 10 días. Después de la administración intravítrea mensual de ranibizumab (0,3 mg/ojo), la concentración máxima de ranibizumab en el suero a las 24 horas varía entre 0,46 y 1,76 ng/mL, y la concentración mínima entre 0,04 y 0,29 ng/mL. La exposición sérica a ranibizumab es unas 90.000 veces menor que la exposición intravítrea al fármaco.<sup>71</sup>

### 2.2.4.3 Bevacizumab

Producido por Genentech Inc/Roche, fue aprobado por la FDA el 26 de febrero de 2004 para uso exclusivo en el cáncer metastásico colorrectal asociado al 5-fluorouracilo y al ácido fólico. La European Medicines Agency aceptó su uso

el 12 de enero de 2005. Se ha ido ampliando su indicación a otras patologías entre las que no se incluye la DMAE húmeda. Es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1, anticuerpo de especificidad única resultante de un solo clon de células plasmáticas. Se desarrolló para inhibir la vascularización de los procesos de crecimiento tumoral. Al igual que ranibizumab, es capaz de inhibir todas las isoformas biológicamente activas del VEGF-A. El peso molecular de bevacizumab es de 149 kDa, tres veces mayor que ranibizumab, lo que teóricamente puede comprometer su penetración en las capas de la retina.

Rosenfeld *et al*<sup>72</sup> observaron que algunos pacientes con diferentes neoplasias y DMAE concomitante tratados con bevacizumab sistémico experimentaron mejoría de su agudeza visual. Basándose en este hecho y para evitar los efectos secundarios sistémicos asociados a la administración intravenosa de bevacizumab, decidieron inyectar el fármaco directamente en el vítreo. Los resultados preliminares fueron muy satisfactorios, lo que avaló el uso intravítreo del fármaco entre los oftalmólogos de todo el mundo.<sup>72,73</sup> No obstante, hasta la fecha la vía de administración intraocular no ha sido aprobada por las autoridades sanitarias. Las dosis usuales pueden variar desde 1,25 mg (0,05 ml) a 2,5 mg (0,1 ml). Su semivida es de 4,3 días y mantiene concentraciones de 10 µg/mL a los 10 días.<sup>70</sup> Su forma de presentación es en forma líquida, con pH de 6,2, cuya concentración es de 25 mg/mL.

#### 2.2.4.4 Afibercept

El afibercept es una proteína de fusión que consiste en porciones de los dominios extracelulares de los receptores 1 y 2 del factor de crecimiento endotelial vascular humano fusionados con la porción Fc de la IgG1 humana, obtenida en células K1 de ovario de hámster chino (CHO) mediante tecnología de DNA recombinante. Está indicado para el tratamiento de la DMAE exudativa. El VEGF-A y el factor de crecimiento placentario son miembros de la familia VEGF de factores angiogénicos que actúan como potentes factores mitógenos, quimiotácticos y de permeabilización vascular para las células endoteliales.

El VEGF actúa a través de dos receptores a tirosina quinasa, VEGFR-1 y VEGFR-2, presentes en la superficie de las células endoteliales. El factor de crecimiento placentario se une solamente a VEGFR-1, que también se encuentra en la superficie de los leucocitos. La activación excesiva de estos receptores por el VEGF-A puede provocar una neovascularización patológica y una permeabilidad vascular excesiva. El factor de crecimiento placentario puede actuar sinérgicamente con el VEGF-A en estos procesos y se sabe que también favorece la infiltración leucocitaria y la inflamación vascular.

El bloqueo de estos receptores producido por el aflibercept inhibe o reduce la NVC patológica retrasando la DMAE. El aflibercept se administra directamente en el vítreo para ejercer efectos locales en el ojo. Tras su administración intravítrea, el aflibercept se absorbe lentamente desde el ojo a la circulación sistémica, en la que generalmente se observa formando un complejo estable e inactivo con el VEGF; sin embargo, solamente el aflibercept libre es capaz de unirse al VEGF endógeno. Después de la inyección intravítrea de 2 mg de aflibercept las concentraciones plasmáticas máximas del fármaco libre fueron bajas, con una media de aproximadamente 0,02 µg/ml y fueron indetectables dos semanas. El aflibercept no se acumula en el plasma cuando se administra por vía intravítrea cada 4 semanas. La concentración plasmática máxima media de aflibercept libre es aproximadamente de 50 a 500 veces menor que la concentración de aflibercept necesaria para inhibir la actividad biológica del VEGF sistémico en un 50% en los modelos animales, en los que se observaron cambios en la presión arterial cuando se alcanzaron niveles de aflibercept libre circulantes de alrededor de 10 µg/ml, que regresaron a los valores basales cuando los niveles cayeron por debajo de aproximadamente 1 µg/ml.

En humanos la administración intravítrea de 2 mg ocasiona una concentración plasmática máxima media de aflibercept libre 100 veces inferior que la concentración de aflibercept necesaria para unirse al VEGF sistémico. Por lo tanto, son improbables los efectos farmacodinámicos sistémicos, como por ejemplo cambios en la presión arterial. El aflibercept libre se une al VEGF formando un complejo estable que se metaboliza y elimina como cualquier otra proteína. Al comparar aflibercept con bevacizumab y ranibizumab, se observaron concentraciones plasmáticas más prolongadas en el tiempo con aflibercept, incluso más allá de los siete días post-inyección.<sup>74</sup> En la tercera fase del estudio VIEW1 y VIEW2, se observó que, administrada mensualmente o cada 2 meses, prevenía la pérdida de agudeza visual en el 95% de los pacientes, produciendo una ganancia de 6,9 a 10,9 letras, comparable al efecto de ranibizumab administrado de forma mensual. Además, a partir de año de dosis administrada regularmente, los pacientes requirieron una media de 4,2 inyecciones durante el segundo año.



# 2.3

## Introducción Vascular endothelial growth factor (VEGF)

---

El proceso de angiogénesis está principalmente dirigido por el VEGF. Es uno de los factores más importantes en la regulación de la formación de vasos sanguíneos y linfáticos durante el desarrollo embrionario y también durante los procesos angiogénicos postnatales tales como la cicatrización y el mantenimiento de la homeostasis de los vasos sanguíneos en adultos. También está implicado en la neovascularización asociada a enfermedades, ya que se encuentra sobreexpresado en tumores sólidos, en algunas neoplasias hematológicas, en pacientes con retinopatía diabética, en artritis reumatoide, en psoriasis y en pacientes con DMAE exudativa.

El VEGF tiene además un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central actuando como un potente factor de neurogénesis y plasticidad neuronal.<sup>75</sup> A consecuencia de esta implicación del VEGF en procesos patológicos se ha evaluado la regulación de su expresión como posible terapia tanto pro como antiangiogénica. La familia del VEGF consiste de siete glicoproteínas que se denominan VEGFA (la más importante en angiogénesis), VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF y también se incluye en esta familia el factor de crecimiento placentario.<sup>75,76-78</sup>

Existen diferentes receptores de los miembros de la familia del VEGF (VEGFR), los cuales son receptores transmembrana del tipo tirosina quinasa, que una vez unidos con su correspondientes ligandos en el dominio extracelular del receptor, dimerizan y se activan a través de una transfosforilación de la tirosina del dominio intracelular dando una señal a través de las vías de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) y Akt, activando de este modo las diferentes cascadas de señalización que resultan en procesos angiogénicos. Estos receptores son el VEGFR1 y VEGFR2, los cuales se unen a VEGFA. El VEGFR3 se une a VEGFC y

VEGFD. Existe una forma soluble de VEGFR1 que inhibe la proliferación de células endoteliales inducidas por el VEGF, secuestrando el VEGF y impidiendo que se una al VEGFR2. Este receptor soluble podría actuar como antagonista específico de VEGFA.<sup>75,76,79,80</sup> El receptor VEGFR2 se expresa predominantemente en células endoteliales vasculares además de en otros tipos celulares, y es el mediador más importante de las respuestas celulares del VEGF, siendo la vía de señalización a través del VEGFR2 para la actividad vasodilatadora, la migración y la proliferación celular del VEGF.<sup>79</sup> En contraposición, el receptor VEGFR1, el cual se expresa en células endoteliales, pericitos, monocitos y macrófagos entre otros tiene poco efecto proliferativo sobre las células endoteliales, pero puede formar heterodímeros con el VEGFR2 aumentando la señal angiogénica.

Así pues, el VEGF es un mitógeno específico de las células endoteliales vasculares, el cual actúa a través de sus receptores por activación de la cascada de señalización, induciendo la proliferación, migración y supervivencia de estas células inhibiendo la apoptosis, así como estimulando la síntesis de moléculas vasodilatadoras.<sup>81,76,78</sup> También es un factor involucrado en la permeabilidad vascular por su capacidad de fenestración endotelial. El VEGF se encuentra regulado por los niveles de oxígeno a través del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF1), y por la expresión de varios factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ ), el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el óxido nítrico, las interleuquinas IL-1 $\alpha$  y IL-6, y oncógenos como mutación o amplificación de Ras, entre otros.<sup>76,81</sup>

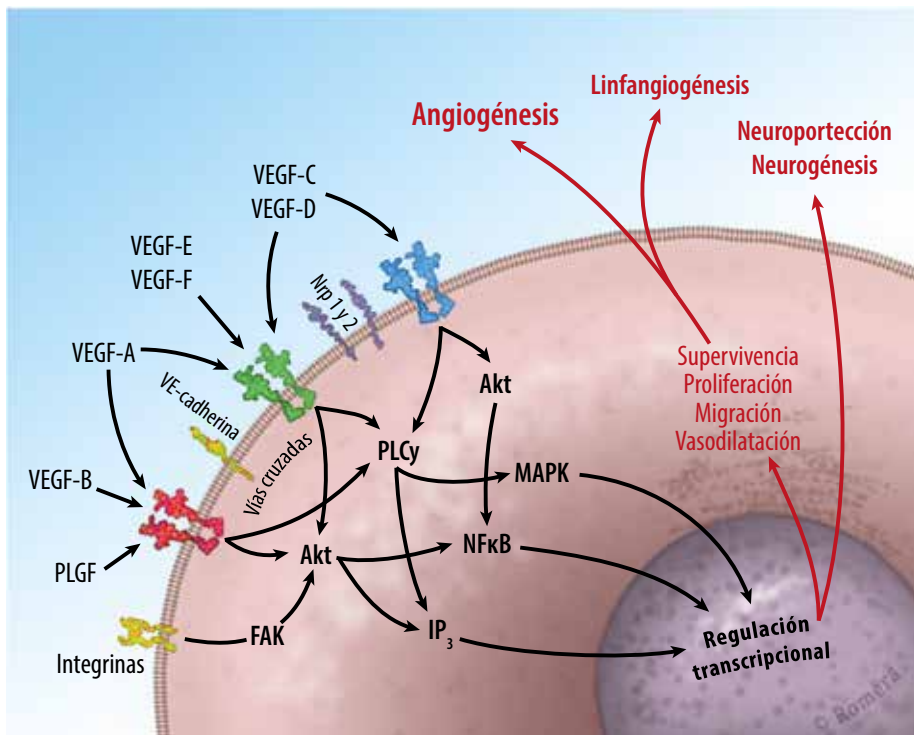
De todas las isoformas, el VEGFA es el componente más importante para la angiogénesis y interacciona con los receptores VEGFR1 y VEGFR2. El gen del VEGFA en humanos se encuentra en el cromosoma 6p21.3 y está compuesto de 8 exones y 7 intrones que a través de un proceso de *splicing* da lugar a cuatro isoformas maduras: VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>. También existen dos isoformas menos frecuentes, la VEGF<sub>145</sub> y la VEGF<sub>183</sub>. Todas las isoformas tienen propiedades biológicas diferentes, pero todas relacionadas con procesos angiogénicos.<sup>76-81</sup>

La VEGF<sub>165</sub> es la isoforma más predominante y se trata de una glicoproteína de 45 kDa homodimérica de unión a la heparina, producida por las células endoteliales, macrófagos o células T activadas, entre otras, con efecto proangiogénico específico para células endoteliales. La VEGF<sub>121</sub> es un polipéptido ácido que no se une a la heparina, mientras que las isoformas VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> son básicas y tienen mucha afinidad por la heparina. Por este motivo, la VEGF<sub>121</sub> es una proteína completamente soluble, mientras que la VEGF<sub>189</sub> y la VEGF<sub>206</sub> se encuentran totalmente



retenidas en la matriz extracelular.<sup>78</sup> La isoforma VEGF<sub>165</sub> presenta propiedades intermedias ya que es secretada pero una fracción importante se mantiene retenida en la superficie celular y en la matriz extracelular. Las isoformas VEGF<sub>145</sub> y la VEGF<sub>183</sub> se unen fuertemente a la heparina y se encuentran secuestradas en la matriz extracelular y la superficie celular, por este motivo son menos activas que la VEGF<sub>121</sub> y la VEGF<sub>165</sub> *in vivo*.<sup>76,81</sup>

A pesar de que la expresión de VEGF, ya sea en exceso o en defecto, está asociada a múltiples patologías, el VEGF también juega un papel clave en la angiogénesis fisiológica y la homeostasis de los vasos sanguíneos en adultos<sup>82</sup> (figura 2). Así pues, el VEGF actúa como un potente factor de supervivencia endotelial ya que induce la expresión de proteínas antiapoptóticas en estas células.<sup>79,81</sup> Se observa una acción paracrina del VEGF que actúa en las células endoteliales adyacentes y una función autocrina del VEGF expresado por las propias células endoteliales para asegurar su supervivencia y mantener la homeostasis vascular.<sup>77v</sup>



**Figura 2.** Vías activadas por las diferentes isoformas de la familia del VEGF y su función celular. Adaptado de Falk T. *et al.* Int J Mol Sci 2010.



# 2.4

## Introducción Pigment epithelium derived factor (PEDF)

---

El factor derivado del epitelio pigmentario, también denominado SERPINF1 (*serine proteinase inhibitor clade F member 1*), fue inicialmente descrito como un factor neurotrófico secretado por las células del epitelio pigmentario de la retina.<sup>83-85</sup> No obstante, posteriormente Dawson D.W. *et al.*<sup>86</sup> lo definieron también como un potente inhibidor endógeno de la angiogénesis. En condiciones fisiológicas normales, existe una actividad antiangiogénica que permite que la vascularización de la retina se mantenga quiescente.

La pérdida de esta situación de quiescencia, y por lo tanto la activación de la neovascularización, produce un crecimiento vascular anómalo que desencadena diferentes patologías. Dawson D.W. *et al.* realizaron un estudio para identificar factores antiangiogénicos en el ojo regulados por el gen de supresión tumoral de retinoblastoma. El análisis de las proteínas sobreexpresadas en ese contexto permitió identificar una glicoproteína de 50 kDa de la familia de los inhibidores de la serina proteasa, el PEDF. Esta glicoproteína fue capaz de inhibir la neovascularización en la córnea de rata *in vivo* y de inhibir la migración de células endoteliales *in vitro* de manera más activa que otras moléculas antiangiogénicas como la angiostatina, la trombospondina-1 o la endostatina. Se observó también que la ausencia de PEDF por neutralización con un anticuerpo anti-PEDF inducía la formación de nuevos vasos sanguíneos en la córnea de la rata a pesar de la ausencia de inductores angiogénicos. Además, el PEDF inhibía la migración de células endoteliales inducida por factores angiogénicos como el VEGF, el PDGF, la IL-8 y el FGF, suprimiendo la proliferación celular y induciendo apoptosis de las células endoteliales de los neovasos en formación sin afectar los vasos maduros ya preexistentes.<sup>86</sup>

El PEDF se expresa durante el desarrollo embrionario sugiriendo que puede estar involucrado en el patrón celular y en la vasculogénesis inicial, a causa de su capa-

cidad de unión a la matriz extracelular, la cual cosa le permite participar en la definición del desarrollo de los vasos sanguíneos.<sup>87</sup> En adultos, el PEDF es sintetizado por un amplio número de órganos incluyendo el sistema nervioso central, cerebro, médula espinal, retina, músculo esquelético, hueso, corazón, placenta, testículos, ovarios y hígado.<sup>88,89</sup> Algunos de estos órganos secretan el PEDF al torrente sanguíneo, donde lo encontramos a una concentración considerable de 100 nM, la cual cosa le permite ser purificado a partir de plasma humano.<sup>90</sup> A nivel celular se expresa en fibroblastos quiescentes para mantener la homeostasis de los vasos sanguíneos, en células endoteliales y en células del epitelio pigmentario de la retina.<sup>91</sup>

### 2.4.1 Estructura del PEDF

El PEDF es una glicoproteína secretada de 50 kDa que presenta una homología tanto en la secuencia como en la estructura secundaria y terciaria con la familia de las serpinas (proteínas inhibidoras de las serina proteasas).<sup>87,89,90,93</sup>

La proteína de PEDF humana está constituida por 418 aminoácidos codificados por un solo gen que se sitúa en el cromosoma 17p13.3. Este gen presenta 8 exones y 7 intrones con una alta conservación en la filogenia.<sup>89</sup> Como otras serpinas, contiene una región denominada *reactive center loop*. A pesar de que no se conoce exactamente cual es su función, se cree que esta región es una diana para la interacción inicial con otros factores y moléculas de la matriz extracelular y de control del sistema del retículo endoplasmático que pueden incrementar el efecto antiangiogénico del PEDF y sus funciones neuroprotectoras.<sup>94</sup> Por otro lado se ha identificado una secuencia señal de secreción altamente conservada entre especies de naturaleza hidrofóbica que permite su transporte y secreción por mecanismos convencionales dependientes del retículo endoplasmático y aparato de Golgi, lo cual indica que las principales funciones se den en compartimentos extracelulares o en la superficie de la célula diana.

No obstante, parece ser que también presenta una señal de localización nuclear y una glicosilación en el extremo C-terminal, y que por lo tanto, a parte de su secreción, el PEDF puede migrar al núcleo para desarrollar funciones como la diferenciación celular y la regulación específica del proceso del ciclo celular como la transición de G1 a G0. En efecto, el PEDF se expresa en estadios de G0 del ciclo celular, a pesar de que se pierde en senescencia de fibroblastos y aumenta la supervivencia y diferenciación de neuronas en cultivo. Precisamente por este motivo el PEDF también se le ha denominado EPC-1 (*early population doubling cDNA-1*).<sup>95</sup> Su estructura cristalina muestra un único motivo inhibidor serpin proteasa y unos dominios de unión a heparina y colágeno, los cuales son importantes para sus funciones antiangiogénicas.<sup>87,89,92,93</sup>

La capacidad de unión del PEDF a heparina o colágeno se da gracias a que presenta una carga asimétrica. Por un lado tiene una parte con alta densidad de residuos básicos (positivos) que interactúan con heparina y glicosaminoglicanos, mientras que en el lado opuesto hay un área rica en residuos ácidos como el glutámico y aspártico cargada negativamente que le permite la unión por interacciones iónicas con las áreas cargadas positivamente de las moléculas de colágeno tipo I y con menos afinidad a las de colágeno tipo II y tipo III.<sup>96</sup> Esta unión al colágeno permite que haya un reservorio de PEDF en la matriz extracelular de algunas células que puede ser la clave en la regulación de la biodisponibilidad de PEDF. Además, este reservorio es esencial para que pueda desarrollar sus actividades antiangiogénicas y neurotróficas.<sup>90,97,98</sup>

En relación al lugar de unión del PEDF a la heparina, del mismo modo que ocurre con otras serpinas, también es importante para su actividad antiangiogénica.<sup>92,93,99,100</sup> Esto es debido a que la unión de PEDF a heparina le produce un cambio conformacional que podría permitir la exposición del epítipo involucrado en la unión al receptor y por lo tanto podría regular las interacciones con los receptores de membrana celular.<sup>101,102</sup>

## 2.4.2 Regulación, señalización y función del PEDF

El PEDF está asociado a múltiples procesos biológicos importantes: antitumorales, antiangiogénicos, neurotróficos, neuroprotectores y de vasopermeabilidad, así también como antiinflamatorios y antioxidativos.<sup>87,86,99,103,104</sup> Existen evidencias que indican que hay regiones separadas en el PEDF que realizan sus dos funciones principales: neuroprotectora y antiangiogénica.<sup>99</sup>

### 2.4.2.1 Función antiangiogénica

A pesar de que no está muy claro cuáles son las vías implicadas en los efectos antiangiogénicos del PEDF, algunos autores han propuesto posibles mecanismos descritos a continuación.

Existen estudios que indicarían que el efecto antiangiogénico del PEDF sería por su acción sobre la ruta de señalización de VEGF y su capacidad de inhibición de la migración celular inducida por varios factores angiogénicos tales como FGF, PDGF, IL-8<sup>86</sup>. Por otro lado, a través de su capacidad de inducción de apoptosis de las células endoteliales proliferantes.<sup>105,106</sup>

Este efecto antiangiogénico del PEDF a través de la actuación sobre la ruta del VEGF se ha demostrado en varios estudios. Por ejemplo, en una línea celular de osteosarcoma se observó que la adición de la proteína PEDF de manera exógena disminuía el VEGF tanto a nivel de mRNA como de proteína, sugiriendo una

posible inhibición de la angiogénesis tumoral por parte del PEDF.<sup>107</sup> En otro estudio, usando en un ensayo *in vitro* células endoteliales de pulmón deficientes en PEDF se observó una mayor capacidad de migración de estas células así como de expresión de VEGF sin afectar la expresión de los receptores VEGFR1 y VEGFR2.<sup>108</sup> Este efecto del PEDF sobre la expresión de VEGF también se observó en patologías como la retinopatía diabética, donde la sobreexpresión exógena de la proteína PEDF inhibía los niveles de VEGF inducidos por la hipoxia en las células endoteliales de la retina. No obstante, este efecto sólo se observó en condiciones patológicas, no en condiciones fisiológicas, indicando que el PEDF tiene un papel importante en el mantenimiento de los niveles normales de VEGF en la retina.<sup>104</sup>

Otros autores han propuesto un mecanismo de inhibición de la angiogénesis mediante la inducción de un corte en el extremo C-terminal del receptor VEGFR1 en el dominio transmembrana. Este corte se produciría por la acción de la  $\gamma$ -secretasa, la actividad de la cual se ha visto incrementada por la acción del PEDF, haciendo que el dominio intracelular del receptor se libere de la membrana plasmática y no se pueda translocar el núcleo impidiendo así la cascada de señalización. Es interesante destacar que este mecanismo antiangiogénico del PEDF solamente se produce en presencia de VEGF. Esto es debido a que la unión del VEGF al VEGFR1 induce un cambio conformacional en el receptor el cual es necesario para que la  $\gamma$ -secretasa pueda proteolizarlo.<sup>109</sup> También se ha observado que el PEDF puede inhibir la fosforilación del VEGFR1<sup>44</sup>, así como disminuir la fosforilación del VEGFR2 en células endoteliales HUVEC en cultivo, reduciendo de esta manera la actividad angiogénica del VEGF<sup>99</sup>. Esta desregulación en el equilibrio entre VEGF y PEDF es la principal responsable de la formación de nuevos vasos sanguíneos aberrantes durante el desarrollo de la DMAE.<sup>40,41</sup> Un estudio reciente ha demostrado que la transición de la DMAE seca a húmeda se da cuando la capacidad del PEDF de regular la proteólisis del receptor VEGFR2 es reducida, generando una desregulación de la señal del VEGF en el EPR.<sup>41</sup> Hay evidencias de que la latencia en la división de las células endoteliales y las funciones de barrera endoteliales en el ojo también son reguladas por el balance entre VEGF y PEDF.<sup>42</sup>

Por otro lado, el PEDF podría presentar una función antiangiogénica a través de un efecto apoptótico. Cuando existe un estímulo angiogénico las células endoteliales expresan el receptor Fas (también conocido como CD95). De esta manera las células endoteliales proliferantes quedan marcadas con el fin de sensibilizarse a la apoptosis cuando se exprese su ligando FasL (CD95L). Factores inhibidores de la angiogénesis como el PEDF inducen un incremento de la expresión de este ligando FasL, induciendo de este modo la apoptosis de las células endoteliales nuevas que migran bajo la influencia de factores proangiogénicos, las cuales expresan niveles relativamente altos del receptor Fas, y por lo tanto son las primeras en entrar en apoptosis.<sup>103,110</sup> Otro mecanismo propuesto es que la inducción de la

apoptosis observado en células HUVEC *in vitro* por parte del PEDF está asociada a la activación de la proteína p38 MAPK mediante su fosforilación. Una vez la p38 MAPK está activada, esta proteína regula el corte de múltiples caspasas como las caspasas 3, 8 y 9 induciendo así la apoptosis. Por tanto, la acción apoptótica del PEDF sería dependiente en parte de la activación de las caspasas, las cuales se ven aumentadas con la expresión del PEDF vía p38 MAPK.<sup>99,106</sup>

#### 2.4.2.2 Función antifibrótica

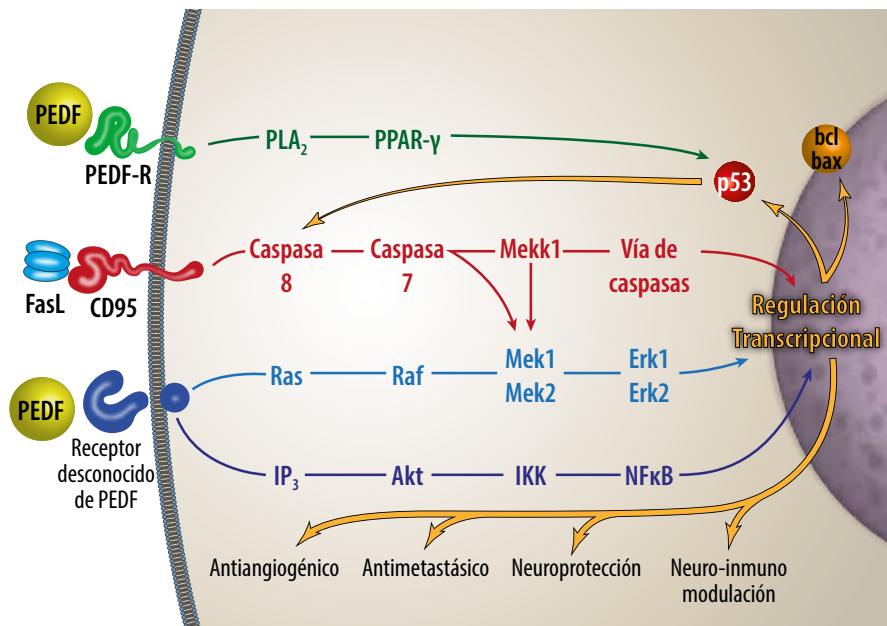
También se ha descrito una función del PEDF antifibrótica en diferentes patologías gracias a su papel regulador de la quiescencia de los fibroblastos.<sup>95,111-114</sup> En estudios en modelo de rata con nefropatía diabética se observó que la sobreexpresión mediante vectores adenovirales de PEDF mejoraba la fibrosis y la proteinuria del riñón de estos animales a través de una disminución significativa de los niveles de fibronectina, así como de la expresión y función de los factores profibróticos TGF- $\beta$ 1 y CTGF (*connective tissue growth factor*). Además también se observó que la sobreexpresión de PEDF incrementaba uno de los principales factores degradadores de matriz extracelular, la metaloproteinasa-2 (MMP-2).<sup>112</sup> De manera muy similar, en un modelo de infarto agudo de miocardio, la sobreexpresión del PEDF reducía la fibrosis cardíaca a través de la disminución de TGF- $\beta$ 1 y de la expresión de colágeno tipo III, mejorando de esta manera la función ventricular izquierda.<sup>115</sup> Paralelamente, en un modelo de pancreatitis en ratón, el cual está asociado a procesos fibróticos, se observó que la expresión de PEDF aumentaba en los animales con pancreatitis inducida, en comparación con el grupo control.<sup>116</sup> No obstante, en casos como la fibrosis pulmonar idiopática o la glomerulonefritis, a diferencia de otras patologías donde un exceso de angiogénesis está asociada a procesos fibróticos, se ha observado que una angiogénesis reducida está asociada a una respuesta fibrótica progresiva.<sup>117,118</sup>

#### 2.4.2.3 Función neuroprotectora

El PEDF es un factor neurotrófico con capacidad de proteger a las neuronas de las diferentes regiones del sistema nervioso central contra un amplio rango de acciones neurodegenerativas que incluyen la axotomía, la excitotoxicidad por glutamato y el estrés oxidativo.<sup>99</sup> Esta neuroprotección del PEDF estaría regulada a través del factor nuclear kappa-B (NF $\kappa$ B). Por ejemplo, en las células del cerebelo el tratamiento con PEDF estimula la fosforilación de I $\kappa$ B, dando una activación y translocación de NF $\kappa$ B al núcleo. A continuación, NF $\kappa$ B induce la expresión de múltiples genes antiapoptóticos y neuroprotectores que controlan la supervivencia celular, la proliferación y muerte de estas células.<sup>99,93</sup>

### 2.4.2.4 Receptores de PEDF

No se ha identificado un receptor específico del PEDF. Se sugiere que puede actuar mediante múltiples receptores,<sup>93</sup> y a causa de la dificultad en identificar los receptores se piensa que el PEDF sigue un patrón de señalización no clásico (figura 3). Se ha observado que el PEDF se une a dos receptores: un receptor de 60 kDa en células endoteliales, y un receptor de 80 kDa que se ha encontrado en células del epitelio pigmentario de la retina y hepatocitos.<sup>119,120</sup> Estudios de Filleur *et al.* demostraron que existen dos epítomos funcionales de PEDF: un péptido 34-mer y un péptido 44-mer. Este último se uniría al receptor de 80 kDa induciendo el efecto neurotrófico, mientras que el péptido 34-mer se uniría al receptor de 60 kDa induciendo la apoptosis, bloqueando la migración de células endoteliales y por lo tanto inhibiendo la angiogénesis.<sup>93</sup> El receptor de 60 kDa corresponde a un receptor de laminina (no integrina) el cual facilita la actividad antiangiogénica y inhibe la proliferación y migración celular. Este receptor interacciona con el PEDF en la membrana celular de las células endoteliales induciendo su apoptosis, inhibiendo la migración y bloqueando la angiogénesis inducida por factores proangiogénicos tales como el VEGF y el FGF.<sup>119</sup> Por otro lado, el receptor de membrana de 80 kDa corresponde a una proteína transmembrana presente en la superficie de las células que se caracteriza por presentar una actividad fosfolipasa A2 y el cual se une con alta afinidad al PEDF.



**Figura 3.** Vías activadas por el PEDF y su función celular. Adaptado de Falk T. *et al.* Int J Mol Sci 2010.



Otra hipótesis propuesta por Ren *et al.* es que el PEDF ejerza sus funciones a través de la interacción con integrinas. Proponen que el PEDF se une a una o más integrinas directa o indirectamente por la vía de la matriz extracelular donde se encuentra concentrado, de manera que se liberan las fosfatasaas unidas a la integrina y estas interaccionan con los receptores de VEGF inhibiendo la vía o bien inhibiendo la activación de kinasas. Las dos opciones bloquearían la fosforilación o transducción de señal inhibiendo así la angiogénesis.<sup>121</sup>

### 2.4.3 PEDF en patología ocular

El balance entre el factor proangiogénico VEGF y el factor antiangiogénico PEDF permite el funcionamiento normal de la retina y determina la formación de vasos nuevos, ya que el PEDF es un antagonista endógeno del VEGF.<sup>122</sup> Las células del EPR una vez diferenciadas incrementan significativamente tanto los niveles de VEGF como de PEDF.<sup>123</sup> Se ha observado una disminución en la expresión de PEDF en pacientes con DMAE,<sup>38</sup> así como también una disminución de la concentración en el vítreo de pacientes con NVC.<sup>39</sup>

Tanto el PEDF como el VEGF se secretan en las células del EPR. Mientras que el VEGF se secreta desde la parte basolateral de las células del EPR, el PEDF lo hace desde la parte apical. En DMAE avanzada, la polaridad de las células del EPR se ve alterada, modificando los niveles de PEDF y VEGF secretados por las células del EPR. Esta pérdida de polaridad provoca una disrupción del equilibrio secretor entre las superficies apical y basolateral del EPR conduciendo a la alteración de la homeostasis retiniana y favoreciendo la aparición de situaciones patológicas.<sup>124</sup>

Actualmente se ha demostrado que el PEDF representa el factor antiangiogénico más potente del ojo<sup>46</sup> y también tiene efecto neurotrófico y antiinflamatorio,<sup>125</sup> siendo considerado como posible diana terapéutica en la prevención de la muerte de células de la retina y control del crecimiento de vasos anormales inducidos por el VEGF.<sup>126</sup>

Recientemente se ha demostrado que la administración subconjuntival diaria de la proteína humana recombinante PEDF, así como el péptido sintético del PEDF 34-mer derivado de las posiciones Asp44-Asn77, es capaz de reducir las lesiones de NVC en el 52% y 47% respectivamente en modelos animales *in vivo*.<sup>127</sup>

Por las características descritas previamente, el PEDF puede tratarse de la diana terapéutica más importante para la DMAE.



# 2.5

## Introducción Modelos animales de DMAE exudativa

---

**D**esarrollar modelos animales de una enfermedad en concreto ayuda en gran medida en el desarrollo de nuevas vías terapéuticas. El modelo animal ideal para estudiar la DMAE sería un modelo poco costoso, que imite los cambios histológicos y funcionales de la enfermedad pero a la vez que tenga una evolución rápida en el tiempo que permita estudios más eficaces. Muchos modelos animales imitan los cambios patológicos que ocurren en DMAE, pero ninguno de ellos las imita todas completamente (figura 4). Desarrollar un modelo que imite los cambios que ocurren tanto en DMAE precoz como en DMAE tardía es un objetivo altamente dificultoso por la cantidad de obstáculos que se presentan. En primer lugar la DMAE es proceso complejo que engloba cambios genéticos y ambientales.

No está provocada por un defecto genético único, sino que existen numerosos polimorfismos genéticos implicados en contribuir a incrementar el riesgo de presentar DMAE. El estrés oxidativo, la inflamación, el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos son mecanismos que también se han implicado en la fisiopatología de la DMAE. Además, la mayor complejidad anatómica de la retina humana en comparación con los modelos animales utilizados añaden mayor dificultad al objetivo. Los animales más habituales que se han utilizado como modelo de DMAE experimental han sido ratones (figuras 5 y 6), ratas, conejos, cerdos y primates no humanos. Los modelos en roedor ofrecen ventajas en cuanto a que tienen un coste bajo, presentan una rápida progresión de la enfermedad y son fácilmente manejables genéticamente. Sin embargo, una clara desventaja que se presenta tanto en ratones como en ratas es la ausencia de una mácula anatómica. Sin embargo los primates no humanos presentan la anatomía retiniana más parecida a un humano,

	RPE Hypertrophy/Plumbeous	Increased Autophagy	Increased Levels of AGE	Immune Cell Accumulation	Chorioidal Neovascularization	Retinal Neovascularization	Retinal Fibrosis	Reference
<b>Complement Factor Pathway</b>				X	X	X	X	
Cfh -/- mice	X	X						Coffey et al., 2007
Transgenic Cfh Y402H mice					X	X		Ufret-Vincenty et al., 2010
Transgenic C3 Overexpression mice		X	X		X	X		Cashman et al., 2011
C3a and C5a receptor -/- mice							X	Nozaki et al., 2006
<b>Chemokines</b>								
Ccl2 -/- and Ccr2 -/- mice	X	X	X	X	X		X	Ambari et al., 2003
Ccl2 -/- mice*	-	X	-	X		X	-	Luhmann et al., 2009
Cx3cr1 -/- mice	X				X	X	X	Combadiere et al., 2007
Ccl2/Cx3cr1 -/- mice	X	X	X		X	X	X	Tuo et al., 2007
<b>Oxidative Damage models</b>								
Immunization with-CEP adducted MSA	X	X	X		X	X	X	Hollyfield et al., 2008
Ceruloplasmin/hephaestin -/- mice		X	X	X	X	X		Hahn et al., 2004
SOD1 knockout mice	X	X				X	X	Imamura et al., 2006
SOD2 knockout mice	X	X	X	X	X	X	X	Justilien et al., 2007
NRF2 -/- mice	X	X	X	X	X		X	Zhao et al., 2007
Cigarette smoke +/- high fat +/- blue light	X	X						Esposito-Heidmann et al., 2006
Hydroquinone in Ccl2 -/- mice								Pons et al., 2011
OXYS Rat	X	X	X			X	X	Markovets et al., 2011
<b>Glucose/Lipid Metabolism</b>								
Aging mice + high fat diet	X	X						Cousins et al., 2002
High glycemic index diet	X	X			X			Uchiki et al., 2011, Weikel et al., 2011
APOE -/- mice	X	X*						Dithmar et al., 2000
APOE2/e4 transgenic mice +/- high fat	X*	X*	X*	X*		X**	X**	Malek et al., 2005
ApoE 3-Leiden transgenic mice +/- high fat	X	X						Kliffen et al., 2000
Apo B100 transgenic mice + high fat	X	X						Fujihara et al., 2009
LDL receptor -/- mice + high fat	X	X*						Rudolf et al., 2005
Vldlr -/- mice	X						X	Heckenroth 2003, Chen 2007
CD36 -/- mice	X						X	Picard et al., 2010
mcd/mcd mice (transgenic mutant cathepsin D)	X	X	X	X		X	X	Rakoczy et al., 2002
<b>Other</b>								
Senescence accelerated mouse	X	X					X*	Takada et al., 1994
<b>Induced CNV</b>								
Matrigel induced CNV	(X)	X			X	X	X	X*
PEG-8 injection					X	X	X	Shen et al., 2006; 2. Cao et al., 2010
PEG-injected MCP mice					X	X	X	Lyzogubov et al., 2011
Rat Subretinal lipid hydroperoxide injection					X	X	X	Jo et al., 2011
VEGF Transgenic mice	(X)				X	X	X	Babe et al., 2010
						X*	X**	Multiple - see text
<b>Naturally-occurring nonhuman primate models</b>								
Rhesus monkey age-related drusen	X	X	X		X	X		Multiple - see text
Cynomolgus monkey age-related drusen	X	X	X		X			Umeda et al., 2005 a
Cynomolgus monkey early-onset drusen	X				X			Multiple - see text
Japanese macaque early-onset drusen	X							Neuringer et al., 2010

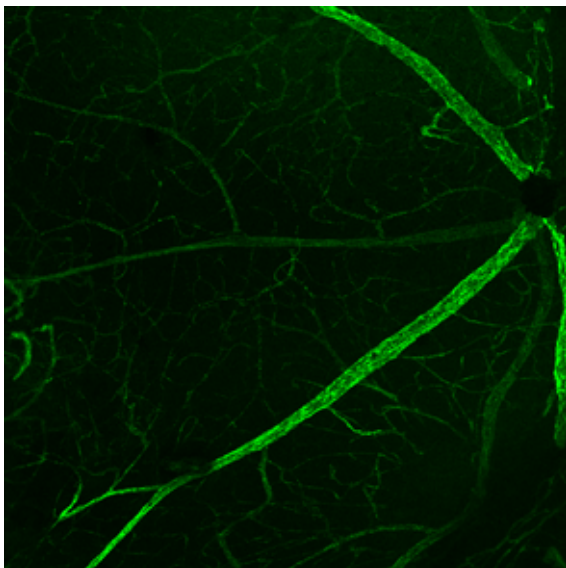
**Figura 4.** Modelos animales que imitan NVC y sus características. Tomado de Pennesi M. *et al.* Mol Aspects Med 2012; 33: 487-509.

pero son difíciles de manipular genéticamente, caros de mantener y el curso evolutivo de la enfermedad es lento.<sup>128</sup>

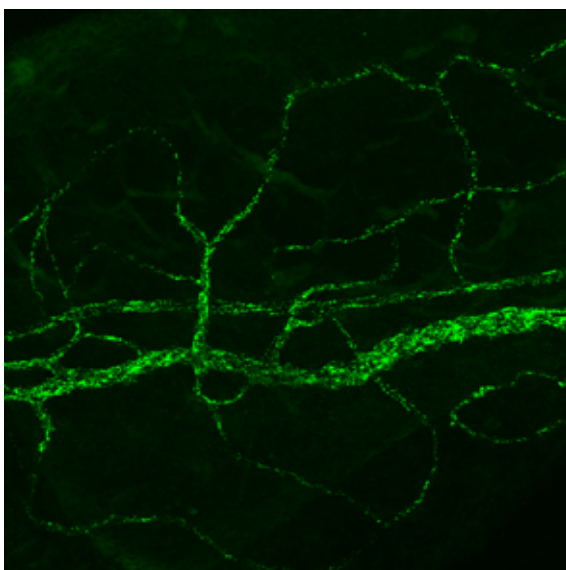
### 2.5.1 Modelo de DMAE exudativa en roedor

La NVC es la lesión representativa de DMAE exudativa y es una causa importante de disminución de agudeza visual en pacientes de edad avanzada. Antes de la era de los tratamientos antiangiogénicos, las opciones terapéuticas para las NVC eran muy limitadas, consistiendo esencialmente en tratamientos ablativos.

Los modelos animales aportaron mucha información acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la formación de la NVC al mismo tiempo que resultaron ser modelos muy reproducibles para identificar y estudiar tratamientos novedosos en un relativo corto período de tiempo. Como conse-



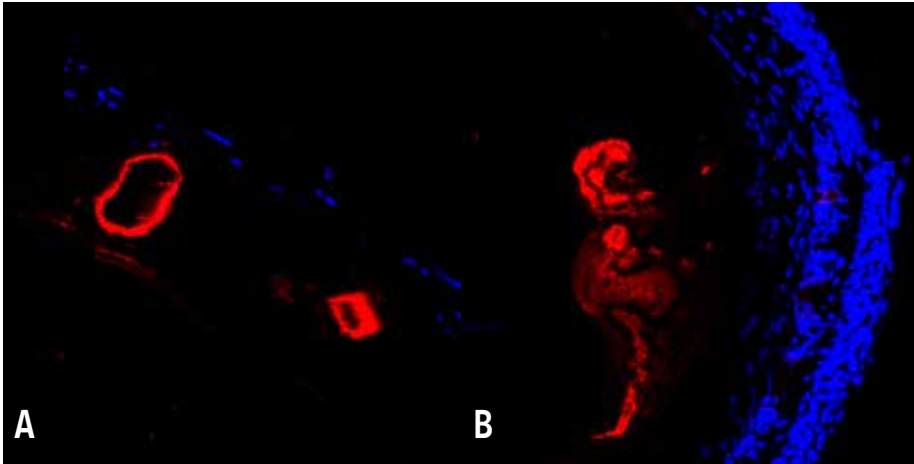
**Figura 5.** Red vascular retiniana del ratón C57BL/6N observada a través de microscopía confocal.



**Figura 6.** Red vascular coroidea del ratón C57BL/6N observada a través de microscopía confocal.

cuencia de esto, la terapia antiangiogénica alteró dramáticamente el pronóstico de los pacientes afectados de DMAE exudativa cambiando el paradigma terapéutico de la enfermedad hacia la farmacoterapia dirigida.

A pesar de los recientes avances en el tratamiento de la NVC, el mecanismo patogénico exacto que desemboca en el desarrollo de la NVC continúa siendo una incógnita en algunos aspectos. Del mismo modo, los modelos animales de NVC están limitados en su capacidad de imitar la compleja cadena de sucesos que conllevan a la aparición de NVC en pacientes con DMAE. Idealmente, un modelo animal de DMAE exudativa debería incluir el componente neovascular de



**Figura 7.** Imagen transversal (A) y sagital (B) de microscopía confocal en la que se muestra la formación de NVC teñido de rojo y las células del EPR teñidas de azul.

la enfermedad pero también los cambios seniles que aparecen en la mácula y que predisponen al crecimiento de los neovasos procedentes de la coroides.

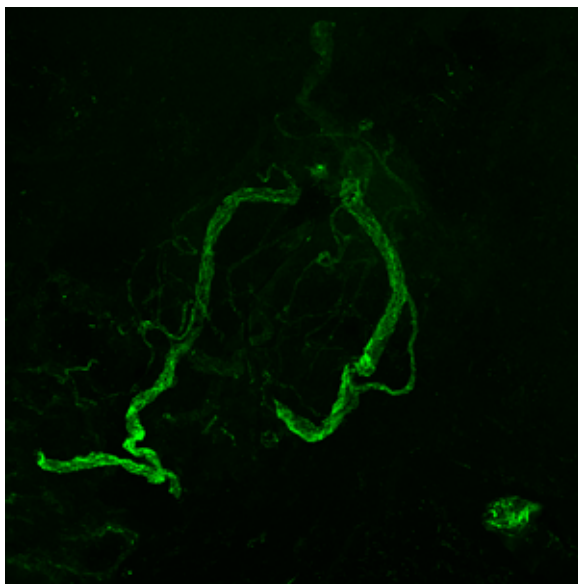
La mayoría de los modelos actuales se basan en realizar lesiones mediante láser o directamente de una manera mecánica crear una lesión en el complejo EPR-membrana de Bruch (figura 7). También existen modelos en los que se altera el EPR y los tejidos circundantes mediante intervenciones externas tales como la inyección de sustancias al espacio subretiniano o internamente como los modelos animales genéticos *knock-out*.

### 2.5.1.1 NVC inducida mediante láser

El modelo de crear una NVC mediante láser fue desarrollado inicialmente en primates no humanos.<sup>129</sup> Actualmente, la adaptación a roedores es la más utilizada (figura 8).

En este modelo se utiliza una alta potencia de láser focalizada en la retina para provocar una rotura en la membrana de Bruch. En 1989 Dobi *et al.* describieron un modelo en rata usando un láser de criptón de 647 nm con unos parámetros de 50-160 mW, *spot* de 100  $\mu$ m y duración de 0,1 segundos.<sup>130</sup> Sus observaciones iniciales fueron que las potencias más bajas no conseguían romper la membrana de Bruch y por lo tanto no desarrollaban una NVC. Sin embargo, las quemaduras excesivamente potentes resultaron en hemorragias coroideas extensas con la consecuente cicatrización avascular y tampoco consiguieron desarrollar NVC.

Las quemaduras que provocaban un *spot* blanco con la formación de burbujas en el centro con o sin hemorragia asociada son las que mostraron más roturas de la



**Figura 8.** Imagen de la formación de NVC en ratón C57BL/6N a través de microscopía confocal.

membrana de Bruch y formación de NVC, y eso lo consiguieron con potencias de láser de 120 mW.<sup>130</sup>

El primer modelo en ratón se publicó por Tobe *et al.* en el año 1998 utilizando también un láser de criptón de 647 nm con unos parámetros de 350-400 mW, *spot* de 50  $\mu\text{m}$  y duración de 0,05 segundos para realizar 3 lesiones en el polo posterior, consiguiendo la formación de NVC en el 87% de los casos a las 2 semanas. Los autores también notaron un incremento en la formación de NVC si observaban las burbujas en el centro al momento de realizar la lesión.<sup>130</sup> También se han utilizado variaciones utilizando un láser de diodo, de argón o incluso Nd:YAG.<sup>132,133,134</sup>

Se han descrito numerosos métodos para analizar las NVC experimentales. A través de angiografía fluoresceínica se puede visualizar la fuga de contraste de las membranas, a pesar de que es difícil de cuantificar. Histológicamente se pueden verificar las NVC sobretodo cuando se utilizan tinciones inmunohistoquímicas tales como la fosfatasa alcalina o anticuerpos CD31 o CD102.<sup>135,136</sup> Sin embargo, es una técnica costosa, difícil de cuantificar y técnicamente complicada para obtener la muestra suficiente necesaria para la evaluación. Otra opción validada para valorar la creación de NVC es el *flatmount* de esclera-coroides-EPR.<sup>137</sup> La técnica consiste en enuclear los ojos para su disección, eliminando el segmento anterior y la retina. Se fija el polo posterior de una pieza compuesta de EPR, coroides y esclera. A continuación se realiza inmunofluorescencia con isolectina-B4 para reconocer las células endoteliales y finalmente se monta en plano (*flatmount*) para ser visualizado en microscopio de fluorescencia. La detección de isolectina B-4 determina las zonas lesionadas en las que hay células endoteliales de tal forma que se estudia la aparición de neovasos. Con el reciente desarrollo de los SD-OCT

portátiles y modalidades avanzadas *in vivo* de captura de imágenes con algoritmos sofisticados de proceso post-adquisición de imagen obtendremos nuevos métodos de elección para estudiar la formación de NVC mediante láser.<sup>133</sup>

El modelo de NVC mediante láser en roedor es atractivo por su bajo coste, por su habilidad en generar eficientemente un alto número de lesiones en un solo ojo en lo que se refiere a temas de análisis estadístico y el corto período de tiempo necesario comparado con el curso natural de la enfermedad en humanos. Del mismo modo que ocurre en el ojo humano, las NVC inducidas mediante láser siguen los mismos estadios de desarrollo: formación precoz de la membrana, establecimiento de una red fibrovascular madura y involución.<sup>138</sup> El tiempo para la formación de una NVC mediante láser es similar en ratones y ratas, con la fase precoz ocurriendo la primera semana y las membranas más maduras alrededor de los 10 días.<sup>137</sup> El principal inconveniente del modelo de DMAE exudativa inducido mediante láser en roedor es la inhabilidad que presenta de reproducir la compleja secuencia de eventos que ocurren previamente y que finalmente terminan en la formación de la NVC. Es un modelo en el que se realiza una lesión aguda y la consecuente inflamación en lugar de ser el resultado de una degeneración senil a lo largo del tiempo y como consecuencia de una inflamación crónica. Existen también diferencias anatómicas en lo que se refiere al efecto de coagulación que se produce en la retina neurosensorial adyacente al realizar el impacto mediante láser, cosa que no ocurre en la DMAE exudativa en humanos. Actualmente se desconoce que extensión de tejido retiniano circundante se puede alterar al realizar la NVC experimental.

Bien sea a través del estudio de los tipos celulares y mediadores de la angiogénesis o a través del uso de modelos transgénicos, el modelo de NVC mediante láser en roedor ha contribuido mucho al actual concepto y entendimiento de la patogénesis de la NVC. Muchos componentes de la cascada angiogénica se han estudiado en modelos murinos de NVC mediante láser, incluido la secreción de FGF-2,<sup>139,140</sup> Ang-2,<sup>141</sup> VEGF,<sup>142-144</sup> óxido nítrico<sup>145</sup> y metaloproteinasas.<sup>146,147</sup> El estudio de señales intracelulares mediante quinasas o el estudio de factores de crecimiento también se han estudiado gracias al desarrollo de este modelo animal,<sup>148,149</sup> así como los diferentes tipos celulares involucrados en la formación de la NVC, tales como macrófagos<sup>144,150</sup> células endoteliales,<sup>130</sup> fibroblastos<sup>139</sup> y las células del EPR.<sup>151</sup> Finalmente, el modelo de NVC experimental en roedor también ha aportado datos en relación al rol de la cascada del complemento.<sup>152,153</sup>

A nivel molecular, el modelo de NVC mediante láser en roedor ha ayudado a establecer el concepto de farmacoterapia en los nuevos tratamientos para la NVC. En el año 1999, Seo *et al.* demostraron una reducción significativa de la NVC en modelo animal mediante láser con el tratamiento vía oral de un inhibidor de la proteína quinasa.<sup>148</sup> Desde entonces, la inhibición farmacológica de la NVC



inducida mediante láser ha sido un área muy activa de investigación: las inyecciones intravítreas de corticoides,<sup>154</sup> fármacos antiangiogénicos y antiinflamatorios,<sup>155-158</sup> anticuerpos<sup>134,159,160</sup> y dispositivos de liberación sostenida<sup>161,162</sup> han sido estudiados mediante este modelo. Incluso el último tratamiento anti-VEGF aprobado recientemente por la FDA para su uso en pacientes con DMAE exudativa (aflibercept) ha sido estudiado previamente en modelo de NVC experimental mediante láser en roedor.<sup>163</sup> También se realizaron ensayos preliminares en modelo animal múrido mediante láser para evaluar la terapia génica como tratamiento coadyuvante a los antiangiogénicos para la NVC<sup>164-166</sup> y que actualmente ya se está desarrollando en humanos. El único inconveniente es la investigación de anticuerpos humanizados mediante este modelo animal; un estudio en ratas no encontró una inhibición significativa en la evolución de la NVC cuando estas fueron tratadas mediante bevacizumab y ranibizumab intravítreo, seguramente atribuible a diferencias entre especies.<sup>167</sup>

### 2.5.1.2 NVC inducida mediante inyección subretiniana

La inyección de sustancias entre la retina neurosensorial y el EPR es un mecanismo adicional para formación de NVC experimental muy prometedor. Con esta técnica se pueden aplicar sustancias angiogénicas muy cerca de la vascularización coroidea y lesionar el EPR durante la inyección, lo que nos permitirá generar una NVC que invada el espacio subretiniano.<sup>141</sup>

#### 2.5.1.2.1 Inyección subretiniana de Matrigel®

Matrigel® es el nombre comercial de una mezcla de proteínas de matriz extracelular, producida y secretada por las células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm. Está disponible en el mercado a través de una compañía biotecnológica y se caracteriza por asemejarse al ambiente extracelular que se encuentra en muchos tejidos. Se utiliza como un sustrato para el cultivo de células. Los principales componentes del Matrigel® son proteínas estructurales como laminina, colágeno, algunos péptidos adhesivos y factores de crecimiento. Esta mezcla es líquida a 4°C y solidifica a 24-37°C, de tal modo que cuando es inyectada *in vivo* se convierte en forma sólida y permite que los factores angiogénicos se liberen de una forma lenta y sostenida. Cuando fue utilizado en ratón se observó una degeneración del EPR y de los fotorreceptores, migración de las células del EPR y formación de NVC.<sup>170</sup> En un modelo similar en ojo de conejo se realizó inyección subretiniana de Matrigel® solo o bien Matrigel® con VEGF, consiguiendo la formación de NVC en el 100% de los casos.<sup>169</sup> Este modelo se utilizó también para evaluar el efecto antiangiogénico del VEGF-trap, y demostró no solamente la inhibición de la NVC en ratas tratadas, sino también el mismo patrón celular a la respuesta neovascular destacando la similitud con las lesiones de DMAE exudativa en humanos.<sup>170</sup> El

hecho de imitar el depósito subretiniano que encontramos en la DMAE exudativa y su capacidad de actuación más larga para promover la angiogénesis, convierte el uso de Matrigel® subretiniano en una técnica muy atractiva.<sup>169,170</sup>

### 2.5.1.2.2 Terapia génica VEGF subretiniana

Numerosos estudios demuestran el importante rol que ejerce el VEGF en la angiogénesis ocular. Las células del EPR son reconocidas como las principales secretoras de VEGF y la disfunción de este sistema juega un papel muy importante en la patogénesis de la NVC.<sup>171</sup> Muchos grupos de investigación han tratado de crear modelos animales de NVC induciendo una sobreexpresión de VEGF en las células del EPR. Se ha descrito la creación de un modelo de NVC en rata mediante inyección subretiniana de vectores adenovirales expresando VEGF.<sup>172,173</sup> Se observó también una mayor duración de los complejos de neovascularización, incluso hasta los 20 meses post-inyección<sup>174</sup>.

El problema de la inyección subretiniana en estos modelos se dilucida mediante los ratones transgénicos. En los ratones rho/VEGF se produce un incremento en la secreción de VEGF de los fotorreceptores, y los cambios observados son en forma de neovascularización retiniana sin NVC.<sup>175</sup> Cuando la sobreexpresión de VEGF ocurre en las células del EPR inducidas, como ocurre en los ratones VMD2/VEGF se observa neovascularización intracoroidea pero sin NVC que penetre la membrana de Bruch.<sup>176</sup> Sin embargo con el trauma local que se realiza en la integridad del EPR al realizar la inyección subretiniana del vector adenoviral si que se observa formación de NVC.<sup>141</sup>

### 2.5.1.2.3 Inyección subretiniana de macrófagos, hidroperóxido lipídico y polietilenglicol

En el intento de imitar exactamente la DMAE exudativa se han inyectado componentes de las NVC en el espacio subretiniano. Por ejemplo, los macrófagos son células importantes que participan en la formación de la NVC, secretan una variedad de factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y se han aislado a partir de complejos neovasculares.<sup>177,178</sup> Jo *et al.* intentaron imitar el aspecto fibrótico de las NVC mediante inyecciones subretinianas de macrófagos en ratones C57BL/6N.<sup>179</sup>

El depósito lipídico en la membrana de Bruch es una característica de la patogénesis de la DMAE.<sup>180</sup> De hecho se han encontrado lípidos oxidados en la membrana de Bruch de pacientes con edad avanzada.<sup>181</sup> La inyección subretiniana de un lípido oxidado (*13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid*, HpODE) promovió la formación de NVC en conejo.<sup>182</sup> Baba *et al.* reprodujeron la inyección del HpODE en rata, observando una degeneración de fotorreceptores, macrófagos

y células del EPR cargados de lípidos y la formación de NVC.<sup>183</sup> Utilizando esta técnica también fue necesario crear una rotura en la membrana de Bruch con el fin de estimular la formación de NVC.

El rol que ejerce la cascada del complemento en la formación de NVC ha sido previamente demostrado en un modelo animal mediante láser.<sup>184</sup> Lyzogubov *et al.* utilizaron polietilenglicol-8 (PEG-8) para crear un modelo animal de NVC.<sup>185</sup> En este modelo, la inyección de PEG-8 promovió la activación de la cascada del complemento y la formación de NVC.



# 2.6

## Introducción Administración tópica de fármacos para el segmento posterior

---

La administración de fármacos al polo posterior del ojo sigue siendo actualmente una tarea complicada debido a las barreras tanto anatómicas como fisiológicas existentes.<sup>186</sup> Las estructuras internas y externas del ojo están protegidas por diferentes barreras que dificultan la penetración de fármacos a la concentración necesaria. La estructura del ojo se divide en dos segmentos: anterior y posterior. El segmento anterior está compuesto por la córnea, el iris, el cuerpo ciliar y el cristalino.<sup>187</sup> El segmento posterior está básicamente compuesto por el humor vítreo, la retina, la coroides y el nervio óptico. Las enfermedades que afectan al segmento posterior tales como la retinopatía diabética, la DMAE, el edema macular diabético, uveítis requieren una inmediata atención para prevenir la pérdida de agudeza visual.<sup>188-190</sup>

Las enfermedades que afectan el polo posterior del ojo presentan unas barreras anatómicas y fisiológicas que harán que las dosis convencionales de colirio, pomadas o soluciones no funcionen adecuadamente. La retina y la coroides son las principales dianas terapéuticas de la mayoría de enfermedades que afectan al polo posterior. Al aplicar un fármaco a nivel tópico las barreras estáticas (capas corneales, barrera hemato-acuosa, barrera hemato-retiniana) y las barreras dinámicas (flujo sanguíneo coroideo y conjuntival, aclaramiento linfático y dilución de la lágrima) impiden que el fármaco alcance la retina. Únicamente 1/100.000 de la cantidad de fármaco observado en la lágrima alcanza la retina y la coroides.<sup>191</sup> Los sistemas más utilizados para tratar las enfermedades del segmento posterior son las inyecciones tanto a nivel sistémico como intraocular y los implantes. La administración sistémica de fármacos no alcanza concentraciones adecuadas en el tejido retiniano y presenta efectos adversos sistémicos severos. Sin embargo, la administración intravítrea proporciona una elevada concentra-

ción de fármaco en la retina con los inherentes efectos adversos que limitan la terapia a largo plazo (incremento de la presión intraocular, hemorragia, catarata y endoftalmitis<sup>192-196</sup>). Además, la naturaleza crónica de las enfermedades retinianas hace que se suelen requerir múltiples inyecciones, incrementando el riesgo de hemorragia vítrea, desprendimiento de retina y progresión de la catarata. La administración periocular permite alcanzar una elevada concentración inicial, debido al efecto *bolus*, seguido de un aclaramiento rápido. Además presentan el riesgo de producir penetración o perforación del globo ocular, fibrosis orbitaria, ptosis y diplopía. Los implantes han mejorado mucho las desventajas de tener que realizar múltiples inyecciones intravítreas; sin embargo, el procedimiento quirúrgico y el riesgo de precipitación del fármaco puede conllevar a efectos indeseados.<sup>197</sup>

Actualmente se están desarrollando nuevas modalidades terapéuticas para facilitar la administración tópica de fármacos. No existen formulaciones tópicas comercializadas para el tratamiento de enfermedades del segmento posterior, sólo algunos compuestos se están investigando en ensayos clínicos. El tratamiento aplicado mediante gotas tiene el potencial de disminuir los efectos colaterales y mejorar la calidad de vida del paciente. Sin embargo, estudios farmacocinéticos han demostrado repetidamente que la transferencia de un fármaco desde una gota hacia la retina o el humor vítreo es limitada, principalmente debido a la larga distancia de difusión desde el lugar de aplicación hasta la retina y por las barreras dinámicas comentadas anteriormente.<sup>198</sup> En los últimos años, algunos investigadores han documentado la capacidad que tienen las moléculas pequeñas de alcanzar concentraciones terapéuticas en la retina y el humor vítreo aplicadas tópicamente.<sup>199-204</sup>

### 2.6.1 Riesgos de las inyecciones intravítreas

En el año 2004, Jager *et al.* publicaron la revisión más importante que se ha llevado a cabo sobre los riesgos de este procedimiento,<sup>205</sup> en un número de 14.866 inyecciones intravítreas de agentes antivirales (ganciclovir, cidofovir, fomivirsén), triamcinolona, fármacos anti-VEGF, gas, TPA, y metotrexato. Se describieron distintos tipos de riesgos: endoftalmitis, incluyendo casos de pseudoendofalmitis (0,3%), desprendimiento de retina (0,9%), hemorragia intraocular (1,3%), catarata (desarrollo o progreso, 9,9%, porcentaje que aumentó cuando el seguimiento era más largo), uveítis/iritis (6,3%), hipertensión ocular mantenida (2,4-38,3%); más raramente hipotensión ocular, atrofia óptica, catarata traumática y obstrucción vascular retiniana.

La hipertensión ocular mantenida, la uveítis y la aparición o progresión de una catarata, estarían relacionados con el fármaco introducido, al igual que la uveítis, la hipotonía ocular y la obstrucción vascular retiniana (cidofovir y fomivirsén). El desprendimiento de retina estaría relacionado con la patología ocular sub-

yacente (retinopatía por CMV y hemovítreo diabético). Este estudio considera la endoftalmitis infecciosa como el riesgo más importante del procedimiento, siendo su probabilidad del 0,3% si se incluyen los casos de pseudoendofalmitis y endoftalmitis con cultivo negativo. Queda reducida al 0,2% en casos de endoftalmitis con cultivo positivo, y la incidencia es del 0,1% si se excluyen los casos por inyección de triamcinolona intravítrea.

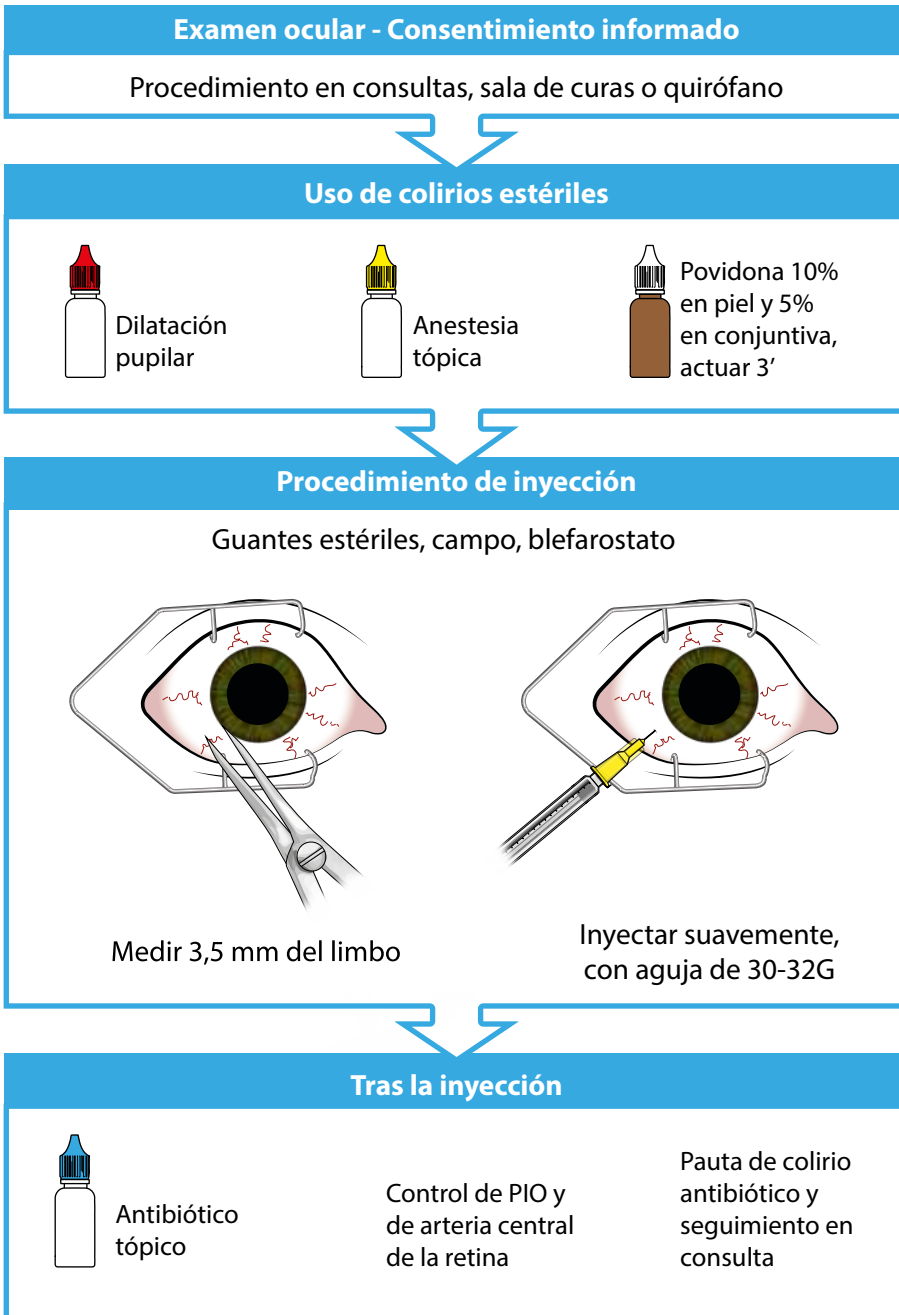
En noviembre de 2005, el comité ético del centro médico del pacífico en California<sup>206</sup> propuso un cuestionario clínico para la recogida de datos de seguridad tras la inyección intravítrea de bevacizumab. Desde noviembre de 2005 a junio de 2006 se recogieron datos de 70 centros de 12 países, con un total de 7.113 inyecciones en 5.228 pacientes, alcanzando las siguientes conclusiones:

En relación con el procedimiento, se describieron las siguientes complicaciones: abrasiones corneales (0,15%), daños al cristalino (0,01%), endoftalmitis (0,014%), desprendimientos de retina (0,04%) y hemorragias subconjuntivales (0,03%).

En relación con el fármaco, se comunicaron los siguientes efectos adversos: inflamación (0,14%), progresión de cataratas (0,01%), oclusión de la arteria central de la retina (0,01%), hemorragia subretiniana (0,06%) y desprendimiento del epitelio pigmentario (0,06%). A nivel sistémico, se halló un 0,21% de casos de HTA, un 0,01% de accidentes vasculares transitorios y también un 0,01% de trombosis venosas profundas.

En enero de 2008, Wu *et al.*<sup>207</sup> publicaron un estudio retrospectivo y colaborativo de PACORES sobre la seguridad y complicaciones de las inyecciones intravítreas de 1,25 mg o 2,5 mg de bevacizumab, con un seguimiento de 12 meses. Recogieron 4.303 procedimientos de inyección intravítrea en 1.310 ojos de 1.173 pacientes. Reportaron complicaciones sistémicas en el 1,5% de los pacientes (0,59% de elevación de la tensión arterial, 0,5% de accidentes cerebrovasculares, 0,4% de infartos de miocardio, 0,17% de aneurismas arteriales ilíacos y 0,4% de muertes), y las complicaciones oculares incluyeron un 0,16% de endoftalmitis bacteriana, un 0,16% de desprendimientos de retina traccional, un 0,09% de uveítis, un 0,02% de desprendimientos de retina regmatógenos y un 0,02% de hemorragias vítreas).

Por otra parte, Moshfeghi<sup>208</sup> publicó una revisión de 19.830 inyecciones intravítreas de fármacos anti-VEGF realizadas, con un resultado del 0,015% de endoftalmitis. Pilli *et al.*<sup>209</sup> publicaron una revisión de 10.254 inyecciones intravítreas de medicación anti-VEGF (406 de pegaptanib sódico, 6.347 de ranibizumab y 3.501 de bevacizumab) en el que se presenta una incidencia de sospecha de endoftalmitis de 0,029%.



**Figura 9.** Algoritmo de la inyección intravítrea de la Sociedad Española de Retina y Vítreo. Actualmente el uso de colirios antibióticos de amplio espectro tras la inyección está discutido. Adaptado de Arias L, *et al.* Manejo de las inyecciones intravítreas. Guías de práctica clínica de la SERV, 2012.



En estudios anteriores de inyección intravítrea de fármacos antiangiogénicos, la incidencia de endoftalmitis por inyección fue de 0,1 a 0,2%.<sup>210-213</sup> Estudios realizados presentaron un riesgo de endoftalmitis infecciosa más alto por inyección de triamcinolona: entre el 0,1%,<sup>209</sup> el 0,2%,<sup>205</sup> el 0,87%<sup>214</sup> y el 1,9%<sup>215</sup>. A esto hay que añadir los casos de endoftalmitis no infecciosa y pseudoendofalmitis por cristales de triamcinolona en cámara anterior: entre el 0,133 y el 0,8%.<sup>216,217</sup> En la figura 9 se muestra el algoritmo de la inyección intravítrea propuesto por la Sociedad Española de Retina y Vítreo en 2012 con el objetivo de disminuir la tasa de complicaciones asociadas.

## 2.6.2 Obstáculos en la aplicación tópica de fármacos para el segmento posterior

El tratamiento de las enfermedades que afectan la parte posterior del ojo es relativamente más complejo y dificultoso comparado con las enfermedades del segmento anterior.<sup>197,218</sup> Además de presentar una distancia de difusión más elevada, la trayectoria de un fármaco administrado por vía tópica es obstaculizado por muchos componentes, por ejemplo el epitelio y endotelio corneal, la conjuntiva, la esclera y la naturaleza acelular de humor vítreo.<sup>219</sup>

Precisamente debido a estas barreras, el desarrollo de fórmulas tópicas para el tratamiento de enfermedades retinianas se ha convertido en impredecible.

Menos de 1/100.000 de la cantidad administrada tópicamente alcanzará la retina, y a menudo esta cantidad estará por debajo de la concentración terapéutica del fármaco.<sup>186,197,220-223</sup> El volumen normal de lágrima en un ojo normal es de 7-9  $\mu\text{l}$ , con una tasa de recambio de 0,5-2,2  $\mu\text{l}/\text{min}$ .<sup>222</sup> Tras la administración de una gota de colirio (35-56  $\mu\text{l}$ ), el volumen de lágrima se ve incrementado, dando lugar a un aumento en la tasa del reflejo de parpadeo. El exceso de volumen es drenado hacia la circulación sistémica a través del conducto lacrimonasal.<sup>224</sup> Los vasos linfáticos y la sangre de los vasos conjuntivales también colaboran al drenaje sistémico del fármaco aplicado tópicamente. A pesar de que no sea del todo cierto, la absorción de fármaco a través de la conjuntiva se considera no productiva debido al drenaje sistémico que realiza. El epitelio escamoso no queratinizado de la córnea y conjuntiva protegen el ojo de patógenos y fármacos.<sup>225</sup> La presencia de bombas que generan flujo de salida como las glicoproteínas-P en el epitelio corneal y conjuntival dificultan también la absorción de fármacos.<sup>28,29,30,31</sup> Todo estos factores conjuntamente disminuyen la absorción de fármacos aplicados tópicamente desde la región precorneal.

Principalmente, la penetración de fármacos a través de la córnea y conjuntiva se realiza mediante un gradiente de concentración, y depende del peso molecular

del fármaco y de su perfil lipofílico. El epitelio corneal y conjuntival actúan limitando la tasa de absorción del fármaco. Dependiendo de su lipofilidad, el fármaco penetrará el epitelio corneal y conjuntival a través de rutas paracelulares o transcelulares. Las drogas hidrofílicas penetran el epitelio a través de una vía transcelular.<sup>230,231</sup> El espacio intercelular del epitelio corneal y conjuntival se encuentra sellado por complejos de unión que dificultan el transporte de compuestos hidrofílicos.<sup>232</sup>

Por otro lado, la cantidad de fármaco que penetra por la vía paracelular disminuye a medida que incrementa su peso molecular. La conjuntiva es entre 15-25 veces más permeable a sustancias hidrofílicas que la córnea, principalmente debido a que presenta un mayor tamaño en el diámetro de los poros paracelulares (3,0 nm), permitiendo penetrar moléculas de entre 5-10 kDa. Sin embargo, el diámetro de los poros paracelulares del epitelio corneal es de 2,0 nm, permitiendo la penetración de moléculas con tamaño inferior a 500 Da.<sup>232</sup> Así pues, la conjuntiva cubre aproximadamente el 8% de la superficie ocular, su densidad de poros es 16 veces mayor al de la córnea y el tamaño del espacio paracelular es aproximadamente 230 veces mayor que el de la córnea.<sup>233</sup> Estas propiedades del epitelio conjuntival ha hecho que tenga mucha más importancia el estudio de la vía de absorción no corneal en el tratamiento tópico de enfermedades de la retina.

La penetración de fármacos a través de las uniones estrechas paracelulares se puede potenciar añadiendo un agente quelante como el EDTA y potenciadores de permeabilidad como el éter polioxietileno-20 estearil.<sup>200,230</sup> A pesar de la elevada permeabilidad que presenta la conjuntiva cuando es aislada, los fármacos que entran a través de esta ruta sufren un aclaramiento rápido en un modelo animal debido a la presencia de circulación sanguínea y linfática.<sup>234</sup> Cuando la fracción de fármaco supera las barreras conjuntivales penetrará a través de la esclera hacia la circulación coroidea y llegará hasta las células del EPR (barrera hemato-retiniana externa) antes de alcanzar la retina neurosensorial.

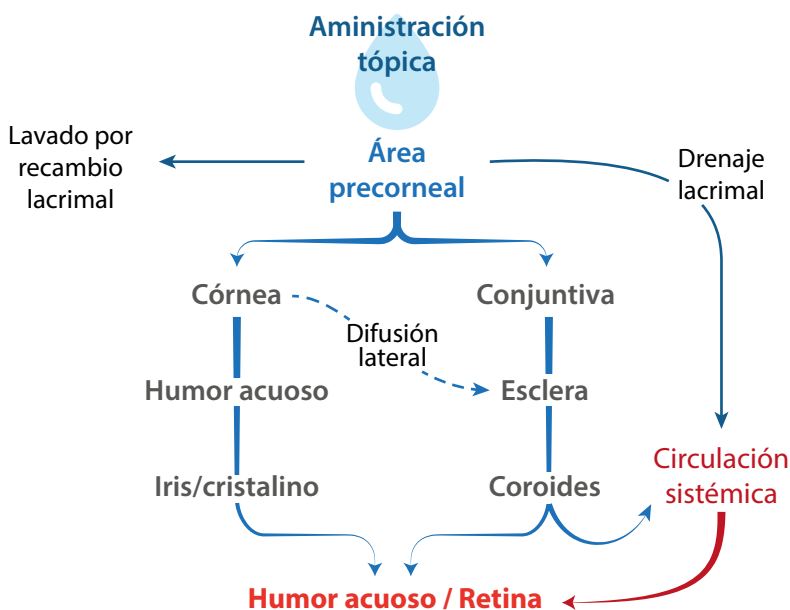
### 2.6.3 Vías de penetración del fármaco hasta el polo posterior

La administración tópica sigue siendo el modo de elección para el tratamiento de enfermedades que afectan al segmento anterior, y los fármacos en forma de colirio constituyen actualmente más del 90% de las medicaciones comercializadas en oftalmología. Sin embargo, a pesar de que esta ruta está bien establecida presenta considerables dificultades a la hora de alcanzar el segmento posterior. Las mismas propiedades anatómicas y fisiológicas que protegen el globo ocular dificultan la correcta absorción de fármacos. A pesar de la baja biodisponibilidad en el tejido retiniano, la administración tópica para el tratamiento de enfermedades retinianas es atractiva por su naturaleza mínimamente invasiva. La absorción no corneal jue-

ga un papel importante en la absorción de fármacos hidrofílicos que difícilmente penetran la córnea.

Menos del 5-10% del fármaco que supera el aclaramiento precorneal entra en el ojo principalmente a través de la córnea<sup>201</sup> y de la conjuntiva<sup>235</sup>. Tras la absorción corneal, el fármaco entra a la cámara anterior y se distribuye alrededor de los tejidos como el cristalino, iris, cuerpo ciliar, vítreo y retina.<sup>201</sup> Algunos estudios indican también que el fármaco que penetra a través de la córnea se difunde lateralmente hacia la esclera y se distribuye en otros tejidos intraoculares.<sup>236</sup> La penetración de fármacos hacia el polo posterior tras absorción no corneal puede ocurrir de tres formas: por difusión a través de la conjuntiva, esclera, coroides y retina, o bien por aclaramiento del fármaco por los vasos sanguíneos conjuntivales hacia la circulación sistémica y re-entrando en el ojo a través de esta, o bien por difusión lateral desde la conjuntiva hacia la córnea, iris, cuerpo ciliar y por lo tanto hacia la cámara anterior y otros tejidos intraoculares<sup>236-238</sup> (figura 10).

Muchos de los estudios realizados para identificar el rol de la rutas corneal y no corneal los realizaron Ahmed y Patton,<sup>239</sup> concluyendo que más del 90% del fármaco absorbido a través de la córnea se queda en la cámara anterior, mientras que el fármaco absorbido a través de la conjuntiva evita la cámara anterior y se



**Figura 10.** Rutas de penetración intraocular de fármacos aplicados de forma tópica. Adaptado de Boddu S. *et al.* Recent Patents on Drug Delivery & Formulation 2014: 8; 27-36.

distribuye principalmente por el tracto uveal y el humor vítreo. También observaron que la absorción corneal incrementa con la lipofiliidad del fármaco y que los fármacos que son esencialmente hidrofílicos entran en el ojo a través de la vía conjuntival. La mayoría de estudios publicados reportan la concentración en la retina de fármacos administrados tópicamente. Sin embargo, las propiedades exactas de la molécula tales como la carga, el peso molecular, la lipofiliidad que incrementa la penetrancia y las concentraciones terapéuticas en los tejidos posteriores no quedan descritos.

## 2.6.4 Fármacos administrados tópicamente para enfermedades del segmento posterior

A pesar de los impedimentos descritos previamente, la ruta tópica sigue siendo una buena opción por la facilidad de acceso y aplicación. Tanto estudios clínicos como preclínicos han demostrado que es posible alcanzar efectos terapéuticos en el segmento posterior tras la instilación tópica del fármaco. Los principales fármacos tópicos estudiados para realizar su función en el polo posterior del ojo son el profármaco TG100801 (*multitargeted kinase inhibitor*), el pazopanib (inhibidor de la tirosina kinasa), la mecamlamine (antagonista nicotínico), la escualamina (aminoesterol), el aganirsén (*antisense oligonucleotide*), la somatostatina y el regorafenib –fármaco antitumoral que bloquea las quinasas implicadas en la angiogénesis tumoral (VEGFR1, -2, -3, TIE2), la oncogénesis (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAFV600E) y el microambiente tumoral (PDGFR, FGFR)–.<sup>240-246</sup>

Los nanosistemas, tales como las nanopartículas o las nanosuspensiones, están poco a poco tomando importancia en el campo de la administración ocular de fármacos.

Los nanotransportadores tienen el potencial de mejorar la eficacia y la biodisponibilidad ocular de fármacos eliminando los problemas que generan las barreras de difusión. Recientemente, Velagleti *et al.* han desarrollado formulaciones nanomicelares para la voclosporina, un inhibidor de la calcineurina de próxima generación.<sup>247</sup> Los estudios de distribución del fármaco a nivel intraocular tras instilación tópica de formulaciones nanomicelares en conejos mostraron una concentración más elevada de voclosporina en retina y coroides, siendo indetectables los niveles encontrados en el humor vítreo. La misma formulación en nanomicelas también alcanzó concentraciones terapéuticas de dexametasona en coroides y retina tras su aplicación tópica en conejos.<sup>248</sup> Sin embargo, el mecanismo exacto a través del cual las nanomicelas alcanzan la retina tras su aplicación tópica se desconoce actualmente.

En la actualidad existe un aumento en la tendencia del uso de proteínas y péptidos en el tratamiento de enfermedades de la retina.<sup>249</sup> Sin embargo no todas consiguen penetrar hacia la parte posterior del ojo tras su aplicación tópica, principalmente debido a su elevado peso molecular (50-100 kDa). Para incrementar su efecto se han utilizado potenciadores de la absorción. Sin embargo, su uso ha resultado ser tóxico para la córnea provocando la pérdida de las uniones adherentes inter-epiteliales.



# *Materiales y Métodos*

## 3

### **3.1 Experimentos "in vitro"**

- 3.1.1 PEDF sintético
- 3.1.2 Ensayo de migración celular
- 3.1.3 Ensayo de formación de túbulos
- 3.1.4 Ensayo de exclusión con azul tripán

### **3.2 Experimentos "in vivo"**

- 3.2.1 Modelo animal de neovascularización coroidea
- 3.2.2 Administración tópica del tratamiento
- 3.2.3 Eutanasia
- 3.2.4 Análisis estadístico
- 3.2.5 Aspectos ético-legales







# 3.1

## Materiales y métodos Experimentos *in vitro*

---

El estudio está diseñado en dos grandes bloques: una primera fase de experimentación *in vitro* y una segunda fase de experimentación *in vivo*. A continuación se explica en detalle el diseño experimental de las dos fases:

Los experimentos *in vitro* fueron realizados con cultivos primarios de células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVEC- *Human Umbilical Endothelial Cells*). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. En esta fase se evaluaron las siete fracciones del PEDF (faPEDF1-7) específicamente desarrolladas para la realización de este estudio.

### 3.1.1 PEDF sintético

El péptido sintético 44-mer derivado de las posiciones de aminoácidos Val78-Thr121 del PEDF humano tiene actividad neurotrófica, mientras que las propiedades antiangiogénicas residen en otro péptido sintético derivado de las posiciones Asp44-Asn77 (34-mer). Se desarrollaron 7 péptidos derivados de la fracción activa 34-mer a través de la compañía BCN PEPTIDES (Barcelona, España).

Los péptidos, cuyas secuencias corresponden a fragmentos de la proteína PEDF, fueron sintetizados en fase sólida. La resina se depositó en el reactor de síntesis equipado con una placa filtrante. La incorporación del residuo C-terminal se realizó sobre resina 2-clorotritilo. El primer aminoácido se disolvió en diclorometano y dimetilformamida. Se añadió N,N-diisopropiletilamina. Se transfirió la disolución con aminoácido y base al reactor y se agitó durante 45 minutos. Pasado ese tiempo se añadió metanol y se dejó reaccionar durante 10 minutos. Se filtró y se descartó el filtrado. La resina se lavó con diclorometano y dimetilformamida. En cada lavado se filtraron y descartaron los filtrados. Para la incorporación de los

aminoácidos siguientes se utilizaron 2,5 Eq de 9-fluorenilmetoxicarbonilo-aminoácido, 2,5 Eq hidroxibenzotriazol y 2,5 Eq N,N'-diisopropilcarbodiimida. Para la reacción de acoplamiento se dejó reaccionar 40 - 60 minutos y se controló la incorporación del aminoácido con un test de ninhidrina. Si el test de ninhidrina era positivo se realizaba una etapa de reactivación durante 15 - 30 minutos con hidroxibenzotriazol y N,N'-diisopropilcarbodiimida.

Si el test de ninhidrina continuaba siguiendo positivo, se realizaba un reacoplamiento con 1,25 Eq de 9-fluorenilmetoxicarbonilo-aminoácido, hidroxibenzotriazol y N,N'-diisopropilcarbodiimida. Si el test de ninhidrina era negativo se continuaba la síntesis con la etapa de desprotección del grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo mediante tratamiento con una disolución de 20% piperidina en dimetilformamida dos veces. Se lavaba 5 veces la peptidil-resina con dimetilformamida, filtrando y descartando los filtrados cada vez y se procedía a la incorporación del siguiente aminoácido.

La etapa de acidólisis se realizó utilizando un cóctel de ácido trifluoroacético con reactivos captadores de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos correspondientes a cada secuencia y precipitando con éter dietílico. Se obtuvieron entre 1 g-1,5 g de péptido crudo. El crudo se purificó en un sistema semipreparativo equipado con una columna NW50 rellena de silica kromasil 10 µm. El péptido se suspendió en ácido acético 0,1N y se añadió resina DOWEX acondicionada en ácido acético 0,1N. El compuesto final contraíón acetato se recuperó por filtración y se caracterizó por HPLC y espectrometría de masas en un Equipo ESI-MS. Todos péptidos sintéticos derivados de la proteína PEDF que se sintetizaron fueron péptidos de peso molecular inferior a 2 kDa.

### 3.1.2 Ensayo de migración celular

Una de las propiedades a evaluar de las faPEDF es la inhibición de la migración de células endoteliales. Para este fin se realizó el ensayo de cicatrización de herida o "Wound Healing" con células HUVEC. Se sembraron placas de 12 pocillos con células HUVEC y se dejaron crecer hasta confluencia. Un vez confluentes, se substituyó el medio de cultivo por medio sin suero para frenar la proliferación; 24 horas después, las células fueron tratadas con 5-fluorouracilo 1 mM durante 15 minutos y seguidamente se realizaron las heridas *in vitro* mediante raspado de la monocapa de células con un raspador de células estéril (BD Falcon, Bedford EE.UU.).

Posteriormente las células HUVEC se lavaron y se aplicaron los distintos tratamientos con VEGF a diferentes concentraciones de las fracciones de PEDF (5, 10 y 50 nM). Se monitorizó el cierre de la herida hasta un máximo de 12 horas realizándose fotografías a través de un microscopio de contraste de fases. Para

la presentación cuantitativa de los resultados, el porcentaje de la distancia total migrada desde el borde de la monocapa se determinó utilizando un software de imagen (Image J) en cinco posiciones distintas (cada 5 mm).

### 3.1.3 Ensayo de formación de túbulos

Las células de endotelio vascular en cultivo tienden a formar estructuras tubulares cuando son cultivadas bajo tratamiento con distintos factores de crecimiento, principalmente VEGF. Con este ensayo, se evaluó la capacidad inhibitoria de formación de tubos de las distintas faPEDF. Se aplicó Matrigel® (10 mg/ml) en una placa de cultivo celular de 0,5 ml/35 mm y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación las células HUVEC fueron tratadas con VEGF y expuestas a diferentes concentraciones de PEDF (5, 10 y 50 nM) durante 16 horas y a continuación fueron lavadas con medio de crecimiento y resuspendidas a una concentración de  $1,5 \times 10^5$  células/ml en un medio de crecimiento celular endotelial como preparación para su tripsinización. A continuación las células se añadieron a las placas de cultivo celular recubiertas con Matrigel®, se incubaron a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>, monitorizándose con una magnificación de 10x entre 6 y 16 horas. Se midió el número de túbulos formados y su longitud utilizando un software de imagen (Image J).

### 3.1.4 Ensayo de exclusión con azul tripán

Para determinar la viabilidad celular se empleó el método de tinción con azul tripán. El azul tripán es un colorante vital que se introduce en el interior de las células que presentan ruptura o daño en la membrana plasmática. Las células que aparecen en el microscopio, de color azul, son consideradas no viables. Para este ensayo las células HUVEC fueron sembradas en medio completo durante 24 horas, seguido de una incubación de 5 horas con FBS al 0,5% y, finalmente, tratadas simultáneamente durante 16 horas con VEGF y diferentes concentraciones (5, 10 y 50 nM) de las siete faPEDF. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y la viabilidad celular se determinó realizando un conteo de las células teñidas de azul (no viables) y de las células brillantes (viables) tras realizar la tinción con azul tripán al 0,2%.



# 3.2

## Materiales y métodos Experimentos *in vivo*

---

Inicialmente se hizo la previsión de desarrollar una segunda fase de experimentación animal *in vivo* siempre que los resultados obtenidos previamente en el estudio *in vitro* fuesen satisfactorios. Los animales utilizados en todos los procedimientos de este experimento *in vivo* fueron ratones C57BL/6N de 6 a 12 semanas de edad (figura 11). Todos los experimentos fueron realizados utilizando anestesia inhalada. La inducción anestésica se realizó en cámara de inducción con una mezcla de isoflurano al 2% utilizando una mascarilla nasal.

### 3.2.1 Modelo animal de neovascularización coroidea

La NVC fue inducida por rotura de la membrana de Bruch mediante aplicación de láser verde en los dos ojos de cada animal. Para realizar esta técnica se utilizó el equipo Micron III (Phoenix Research Labs, Pleasanton CA, USA). Este equipo permite la realización de lesiones con láser verde de 532 nm en ratones de una manera efectiva y reproducible, optimizando la obtención de NVC en más del 90% de los casos. Se realizaron 4 lesiones en cada ojo en las posiciones 3, 6, 9 y 12 horas (posición de reloj) en el polo posterior a la misma distancia del nervio óptico en 30 ratones.

Se probaron diferentes potencias (100-1000 mW), duración de impacto (50-200 ms) y tamaños de *spot* (50-75  $\mu\text{m}$ ) para optimizar los parámetros del láser al realizar la lesión y obtener así un modelo fiable y actualizado de NVC en ratón C57BL/6N.

El diseño del estudio de formación de NVC en modelo animal y su optimización se muestra esquemáticamente en la figura 12.



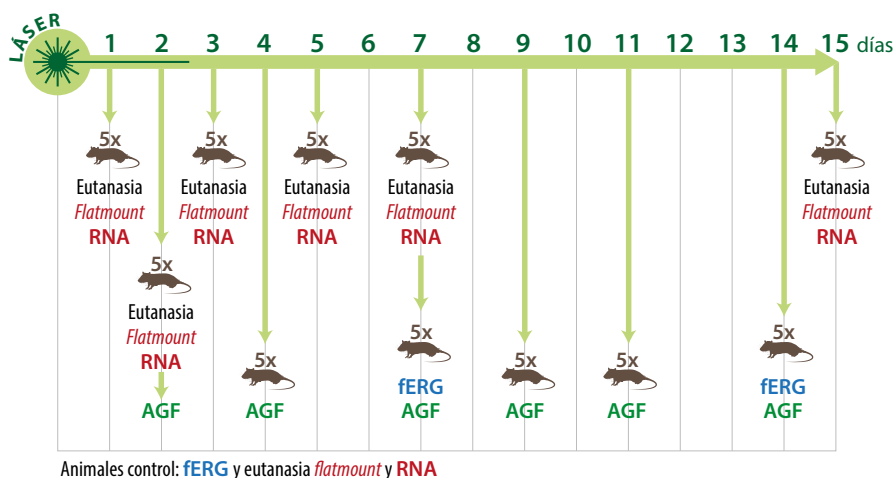
**Figura 11.** Ratones C57BL/6N de 6 a 12 semanas de edad utilizados para el ensayo.

Los 30 ratones se dividieron en 6 grupos de 5 animales cada uno, que recibieron eutanasia los días 1, 2, 3, 5, 7 y 15 post-láser para estudios *post mortem*. El grupo de 5 ratones que se mantuvo con vida hasta los 15 días fue utilizado para la realización de pruebas *in vivo* (angiografía fluoresceínica y electroretinograma focal, fERG).

Una vez sacrificados, un grupo de 15 ratones se utilizó para disección y montaje del polo posterior en forma de *flatmount* (EPR+coroides+esclera) y realización de inmunofluorescencia para detección de células endoteliales. Dicha técnica permite la detección de posible neovascularización en las zonas de lesión corioidea. El otro grupo de 15 ratones se utilizó para extracción de RNA de la retina para estudio de expresión génica mediante q-PCR de genes relacionados con la inflamación (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*), estrés glial (GFAP, proteína gliofibrilar ácida) y angiogénesis (VEGF).

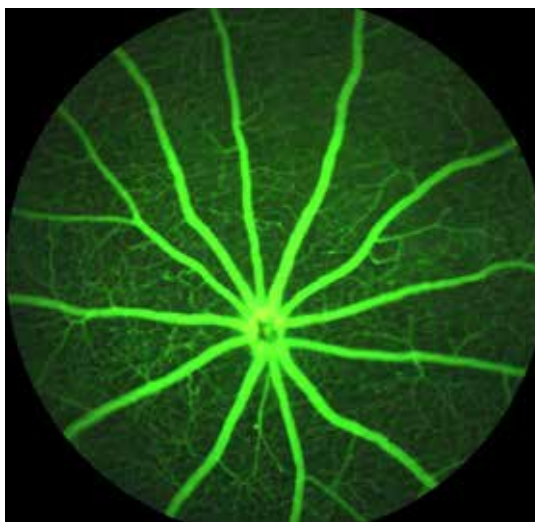
### 3.2.1.1 Angiografía fluoresceínica

La angiografía fluoresceínica se fundamenta en la administración de un compuesto fluorescente (fluoresceína sódica) que pasa al torrente sanguíneo tras su administración intraperitoneal. Cuando el contraste alcanza los vasos de la retina, y mediante un filtro de fluorescencia, se realizan imágenes de toda la red vascular retiniana (figura 13) para el estudio esencialmente de exudación y difusión de contraste que mostraran las áreas de NVC (figura 14).

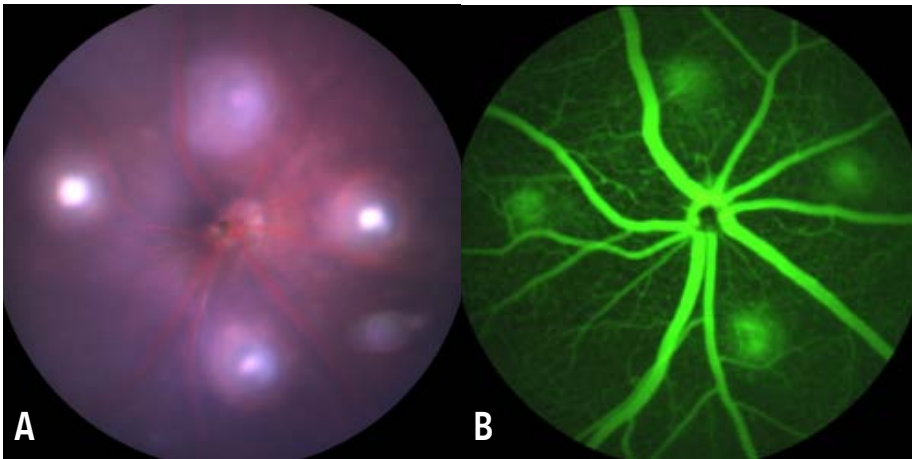


**Figura 12.** Distribución por grupos de ratones C57BL/6N. Se dividieron en 7 grupos de 5 animales cada uno. Cinco grupos se sacrificaron los días 1, 2, 3, 5 y 7. Un último grupo se sacrificó a los 15 días, realizándose angiografía fluoresceínica los días 2, 4, 7, 9, 11 y 14 y electroretinograma focal los días 7 y 14. Cinco animales fueron el grupo control sin láser, realizándose el estudio flatmount, RNA y electroretinograma focal.

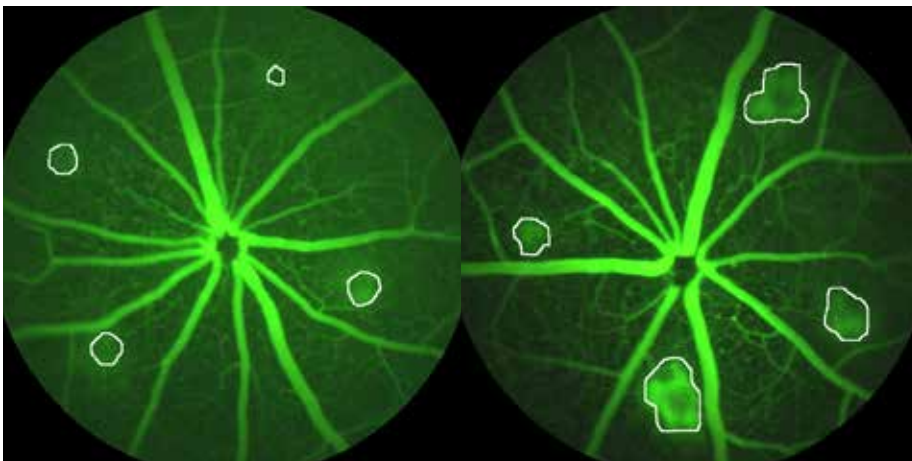
La angiografía fluoresceínica se realizó los días 2, 4, 7, 9, 11 y 14 para el estudio de la evolución de las lesiones y aparición de neovasos. Para la realización de esta prueba se anestesiaron los animales, se les dilató la pupila con tropicamida tópica y se les inyectó 10  $\mu$ l/g de fluoresceína sódica al 1% por vía intraperitoneal, analizando las imágenes del fondo de ojo con filtro fluorescente a los minutos 1, 5 y 10 post-administración. Para medir el tamaño de las lesiones se utilizó el software de imagen Image J (figura 15).



**Figura 13.** Imagen de angiografía fluoresceínica que muestra la red vascular retiniana en ratón C57BL/6N.



**Figura 14.** Imagen de fondo de ojo (A) y angiografía fluoresceínica (B) de la NVC realizada mediante láser verde.



**Figura 15.** Método de cuantificación del área de difusión de contraste de cada lesión mediante AGF utilizando el software del programa Image J.

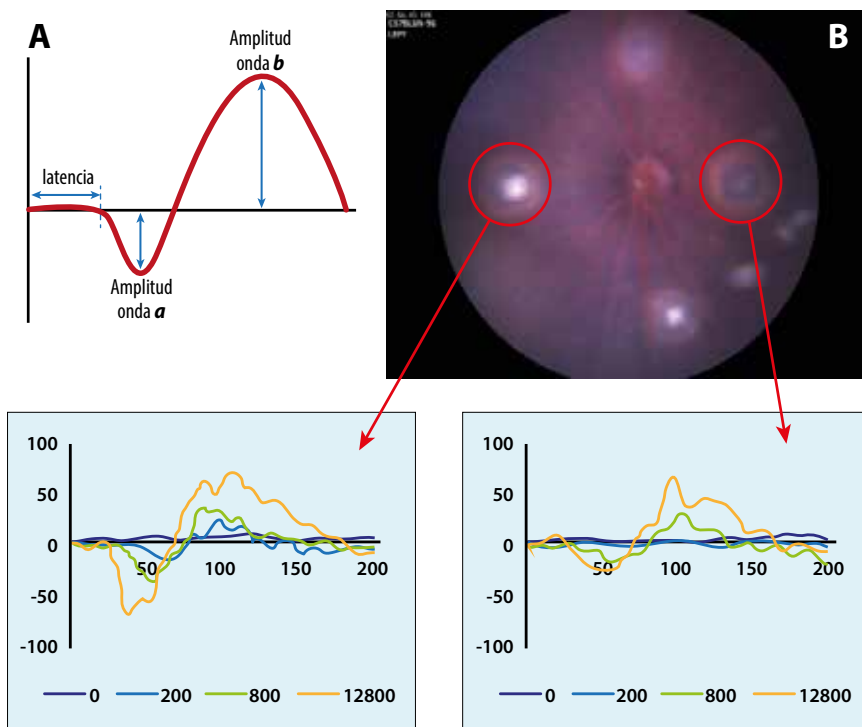
### 3.2.1.2 Electrorretinograma

El electroretinograma consiste en la estimulación de la retina mediante flashes de luz a diferentes intensidades y la lectura de la respuesta retiniana a través de un electrodo colocado en la córnea. Sirve para medir la actividad eléctrica de la retina y así poder cuantificar la funcionalidad en cuanto a la transmisión de impulsos nerviosos. El fERG nos permite medir esa actividad en una zona concreta de la retina. La estimulación mediante flashes de luz y la consiguiente lectura de impulsos se puede realizar en condiciones fotópicas (el ojo está adaptado a la luz) o escotópicas (el ojo está adaptado a la oscuridad).



Dependiendo del grado de adaptación la respuesta que obtendremos será diferente. La respuesta eléctrica retiniana se manifiesta como una onda cuyos principales componentes por orden de aparición son: la onda a (negativa), que se origina en los fotorreceptores: conos y bastones, y las ondas b1 y b2 (positivas) con origen en las células de Müller y las células bipolares (figura 16). Las células ganglionares no participan en el fERG. Para el estudio se realizó únicamente fERG escotópico debido a que la retina de los ratones se encuentra mínimamente poblada de conos, siendo los bastones la mayoría de fotorreceptores existentes. Los animales fueron adaptados a la oscuridad las 12 horas previas a la realización de la prueba. Posteriormente se les anestesió y se dilataron las pupilas con tropicamida tópica. Se colocaron los electrodos, y el *spot* se ubicó en la zona de interés (lesión/no lesión) para la posterior realización del fERG. Se evaluó la respuesta de la retina a diferentes intensidades de flash de luz.

El fERG se realizó para el estudio de la función de la retina en las zonas lesionadas los días 7 y 14. Los 5 animales restantes que no fueron sometidos a fotocoagulación



**Figura 16.** A: un fERG normal muestra una onda a negativa (intensidad fotorreceptores) y una onda b positiva (intensidad capas internas de la retina formadas por células bipolares y células de Müller). El tiempo de latencia indica la rapidez en la respuesta. B: fERG en 2 zonas de NVC provocadas con láser verde donde se observa una disminución de las ondas a y b así como un incremento en el tiempo de latencia, sugiriendo daño en el tejido retiniano.

fueron utilizados como controles tanto en las pruebas *in vivo* (fERG y angiografía fluoresceínica) como en las pruebas *post mortem* (inmunofluorescencia en *flatmount* y q-PCR).

### 3.2.1.3 Inmunofluorescencia en "flatmount"

Para la identificación y detección de células endoteliales se realizó inmunofluorescencia en *flatmount*. Para realizar esta técnica, se procedió a enuclea los ojos de los ratones C57BL/6N y su posterior inmersión en PBS. Se realizó la disección de los ojos en fresco, iniciando el corte a través de la *ora serrata*, eliminando el polo anterior, la retina y manteniendo el complejo EPR-coroides-esclera. Se fijó durante 30 minutos en MetOH a -20 °C y posteriormente se lavó tres veces durante 10 minutos en PBS y Tween-20 al 0,1%. A continuación se bloqueó la muestra en PBS, Tween-20 al 0,1% y BSA al 3%. Se añadió isolectina B4-FITC (1:50) y se montó en plano con fluoroshield en un portaobjetos, guardándolo en condiciones de oscuridad a 4 °C. Posteriormente se visualizaron las preparaciones en un microscopio de fluorescencia. Para evaluar de la formación de NVC en el modelo animal se realizó un análisis cualitativo de las zonas lesionadas, observando la aparición de las estructuras que preceden a la formación de células endoteliales. Para la evaluación del tratamiento tópico con la faPEDF se realizó un análisis cuantitativo del área de neovascularización formada, utilizando un software de imagen (Image J).

### 3.2.1.4 Extracción de RNA de retina y análisis de expresión génica mediante q-PCR

Para la evaluación de la expresión génica de genes relacionados con la inflamación (MCP-1), estrés glial (GFAP) y angiogénesis (VEGF) se procedió a la extracción de RNA de retina y su posterior análisis mediante q-PCR. Para la extracción de RNA a partir de un cultivo celular se retiró todo el medio de la placa de cultivo y se lavaron las células con 500 µl de PBS. Posteriormente se añadió 1 ml de Trizol por cada 10 cm<sup>2</sup> y se desengancharon las células de la placa de cultivo con un raspador en frío (sobre hielo) para pasarlas a tubos de Eppendorf.

El homogenizado resultante se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de cloroformo por ml de Trizol inicial y se incubó de nuevo durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación se cuantificó la concentración de RNA mediante el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). En una segunda fase se realizó el tratamiento con DNasa mezclando 2 µg de RNA, 0,5 µl de DNasa, 1 µl de *buffer* y H<sub>2</sub>O hasta 10 µl. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente se añadió 1 µl de EDTA 50 nM para volverlo a incubar durante 5 minutos a 75 °C. A continuación se procedió a la retrotranscripción utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive

Kit (Applied Biosystems, Cat No. 4322171) y finalmente se realizó la real time PCR utilizando el compuesto orgánico SybrGreen y el equipo LightCycler 480 (Roche Diagnostics).

### 3.2.2 Administración tópica del tratamiento

Las faPEDF elegidas fueron preparadas en forma de colirio por la empresa BCN PEPTIDES (Barcelona, España). En base a los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* y a la estabilidad de las diferentes fracciones se decidió iniciar la fase *in vivo* con la faPEDF3. La faPEDF2 se descartó no por su eficacia demostrada en los ensayos *in vitro* sino por ser inestable en forma de colirio debido a sus características bioquímicas. Se programó un experimento ciego con los tratamientos A, B y C, sabiendo que uno era placebo, uno contenía la molécula escogida, en este caso la faPEDF3 a una dosis de 1 mg/ml y el otro contenía la faPEDF3 a una dosis de 10 mg/ml. Sólo el laboratorio BCN PEPTIDES conocía qué fármaco se administraba en cada caso, de manera que el ciego diseñado para el estudio sólo se destapó un vez finalizado el mismo y analizado los resultados. El colirio A contenía faPEDF3 1 mg/ml, el colirio B faPEDF3 10 mg/ml y el C placebo.

El diseño del estudio *in vivo* de tratamiento tópico se muestra esquemáticamente en la figura 17.

	RNA		Inmunofluorescencia en flatmount	
Días post-láser →	3 días	7 días	14 días	Total grupo
Tratamiento A faPEDF3 1 mg/ml	4 ratones	3 ratones	3 ratones	10 ratones
Tratamiento B faPEDF3 10 mg/ml	4 ratones	3 ratones	3 ratones	10 ratones
Tratamiento C Placebo	4 ratones	3 ratones	3 ratones	10 ratones
<b>Total por técnica</b>	<b>12 ratones</b>	<b>9 ratones</b>	<b>9 ratones</b>	

**Figura 17.** Diseño experimental y distribución por grupos de tratamiento con colirio de faPEDF3. En el ojo adelfo del grupo RNA no se realizó láser y sirvió de grupo control para el estudio de expresión génica mediante q-PCR.

Se utilizaron un total de 30 ratones distribuidos en 3 grupos de 10 animales cada uno en función del número de días que fueron tratados tras la inducción de la NVC y de los cuales se formaron subgrupos de tratamiento con colirio A, B y C.

Un primer grupo de 9 animales (grupo 7 días) se dividió en tres subgrupos de 3 animales cada uno para ser tratados con los colirios A, B o C. Este grupo empezó el tratamiento dos días antes de realizar la lesión con láser y hasta 7 días después, cuando los animales fueron sacrificados. Un segundo grupo de 9 animales (grupo 14 días) se dividió en tres subgrupos de 3 para ser tratados con los colirios A, B y C respectivamente.

Los ratones empezaron a tratarse dos días antes de realizar la lesión con láser y hasta 14 días después, cuando se aplicó eutanasia a los animales. Estos dos grupos, una vez sacrificados, fueron utilizados para disección y montaje del polo posterior en forma de *flatmount* (EPR+coroides+esclera) y realización de inmunofluorescencia para detección de células endoteliales (anti-isolectina B4). Un tercer grupo de 12 animales (grupo RNA) se dividió en tres subgrupos de 4 animales que fueron tratados con los colirios A, B y C respectivamente. Este grupo empezó el tratamiento dos días antes de realizar la lesión con láser y hasta 3 días después, cuando los animales fueron sacrificados.

El ojo adelfo de este último grupo recibió también tratamiento pero sin haberse realizado lesión previamente con láser, de manera que fueron el grupo control para el análisis de expresión génica. Los ojos de estos animales, una vez sometidos a eutanasia, fueron utilizados para realizar extracción de RNA de la retina para estudio de expresión génica mediante q-PCR de genes relacionados con la inflamación (MCP-1), estrés glial (GFAP) y angiogénesis (VEGF).

Paralelamente, todos los grupos fueron utilizados para la realización *in vivo* de angiografía fluoresceínica los días 3, 7 o 14 en función del grupo en el que se encontraban para el estudio de evolución de las lesiones y confirmar la aparición de neovascularización.

Previamente al inicio del ensayo de administración tópica del tratamiento se efectuaron varios estudios para determinar la ventana de tiempo óptima para la duración del tratamiento tópico en el modelo animal, motivo por el cual no se realizó tratamiento en ningún grupo durante más de 14 días. Todos los grupos recibieron una pauta de instilación única de colirio cada 24 horas.

### 3.2.3 Eutanasia

Todos los animales fueron sometidos a eutanasia con CO<sub>2</sub> según el protocolo ético establecido.

### 3.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA univariante, el test comparativo múltiple de Bonferroni y *t*-student para todos los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

### 3.2.5 Aspectos ético-legales

Este estudio fue evaluado y aprobado por el comité ético local, siguiendo las directrices que marcan el Comité Ético de Experimentación Animal y el Centro Nacional de Biotecnología, que son los órganos encargados específicamente de dar cumplimiento al RD 53/2013 de 01 de febrero de 2013, que establece en su capítulo VI, artículo 37 la “Creación de los órganos encargados del bienestar los de los animales”. Se establecieron y revisaron los procesos operativos internos con respecto al control, la comunicación y el seguimiento de la información relacionada con el bienestar de los animales.

Previamente al desarrollo del estudio, se evaluaron y consideraron posibles estrategias experimentales alternativas a la utilización de animales de laboratorio y se garantizó que los objetivos no podían ser alcanzados por dichos procedimientos.

Se utilizaron el menor número de animales posibles para la consecución de los objetivos, así como también se veló para que los animales no sufrieran innecesariamente, proporcionándoles analgésicos, anestésicos y otras sustancias apropiadas.

Los métodos eutanásicos empleados se adecuaron a la especie en cuestión, utilizando en este caso CO<sub>2</sub>.

Todo el personal que participó en los procedimientos estaba acreditado y entrenado para desempeñar las tareas que les correspondía.



# Resultados

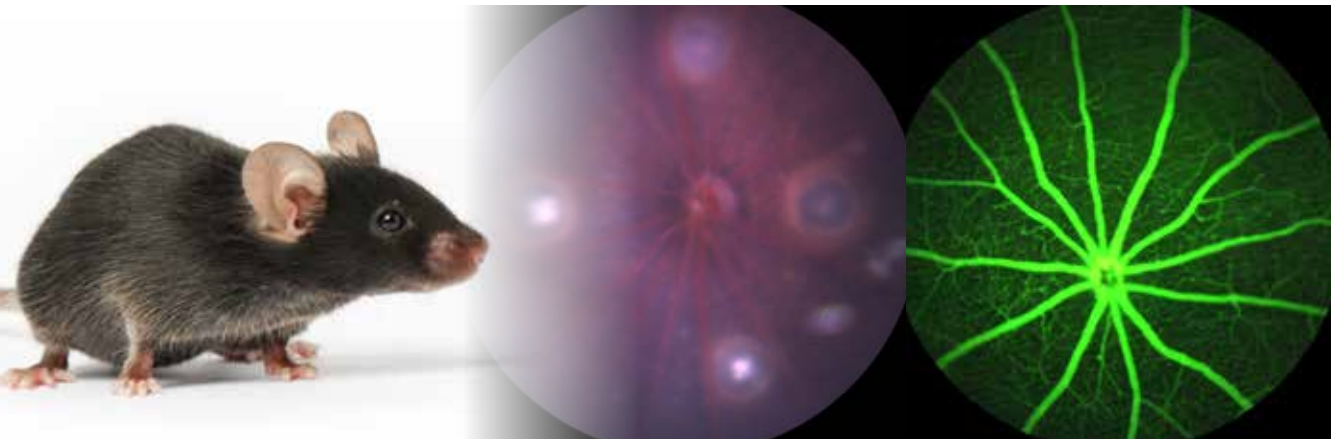
## 4

### 4.1 Resultados de los experimentos in vitro

- 4.1.1 Resultados del ensayo de migración celular
- 4.1.2 Resultados del ensayo de formación de túbulos
- 4.1.3 Resultados del ensayo de exclusión con azul tripán

### 4.2 Resultados de los experimentos in vivo

- 4.2.1 Modelo animal de neovascularización coroidea
- 4.2.2 Administración tópica del tratamiento







# 4.1

## Resultados Experimentos *in vitro*

Cada una de las 7 fracciones activas de PEDF derivadas de la cadena terminal 34-mer fueron evaluadas *in vitro* para determinar cuál de ellas presentaba mayor actividad antiangiogénica (figura 18), obteniéndose los siguientes resultados.

10	20	30	40	50	60		
MQALVLLLCI	GALLGHS	SCQ	NPASPPEEGS	PDPDSTGALV	EEE	DPFFKVP	VNKLAAAVSN
70	80	90	100	110	120		
FGYDLRYVRS	STSPPTN	VLL	SPLSVATALS	ALSLGAEQRT	ESIIHRALY	DLI	SPDIHG
130	140	150	160	170	180		
TYKELLDIVT	APQKNLKSAS	RIVFEKKLR	KSSFVAPLEK	SYGTRPRVLT	GNPRLDLQEI		
190	200	210	220	230	240		
NNWVQAQMKG	KLARSTKEIP	DEISILLGV	AHFKGQWVTK	FDSRKT	SLED	FYLDEERTVR	
250	260	270	280	290	300		
VPMSDPKAV	LRYGLSDSLS	CKIAQLPLTG	SMSIIFFLPL	KVTQNLTLE	ESLTSEFIHD		
310	320	330	340	350	360		
IDRELKTVQA	VLTVPKLKS	YEGEVTKSLQ	EMKLQSLFDS	PDFSKITGKP	IKLTQVEHRA		
370	380	390	400	410			
GFEWNEDGAG	TTPSPGLQPA	HLTFPLDYHL	NQPFIFVLRD	TDTGALLFIG	KILDPRGP		

En verde: 34-mer

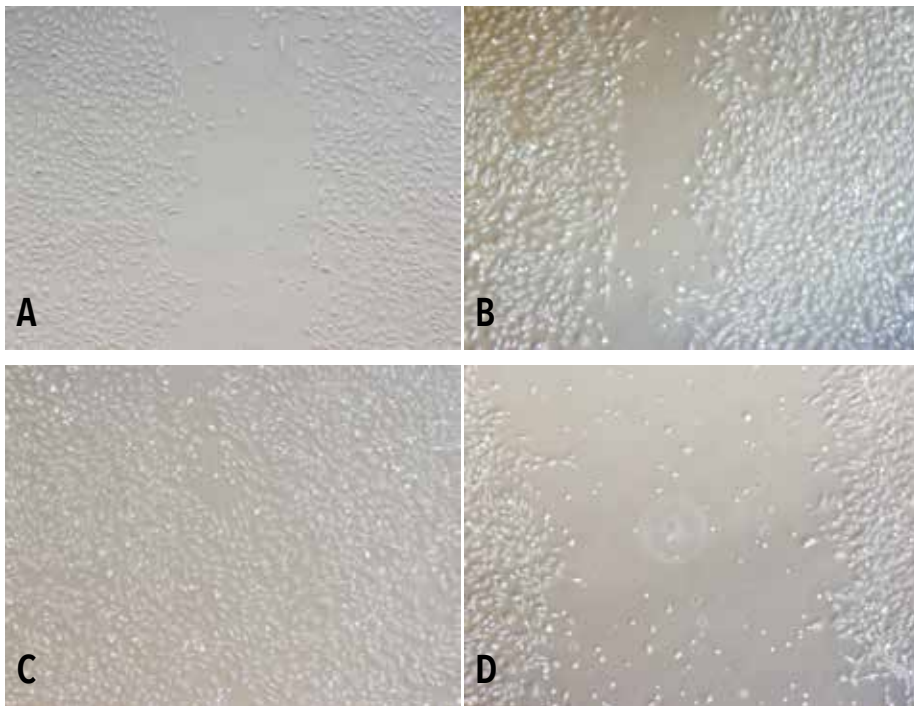
En rosa: región que incluye la Ser227, cuya modificación por Glu hace perder al PEDF su efecto antiangiogénico.

En azul: 44-mer

**Figura 18.** Las propiedades antiangiogénicas del PEDF residen en las posiciones del péptido Asp44-Asn77 (34-mer). Las siete fracciones especialmente desarrolladas para este estudio derivan de la fracción 34-mer.

### 4.1.1 Resultados del ensayo de migración celular

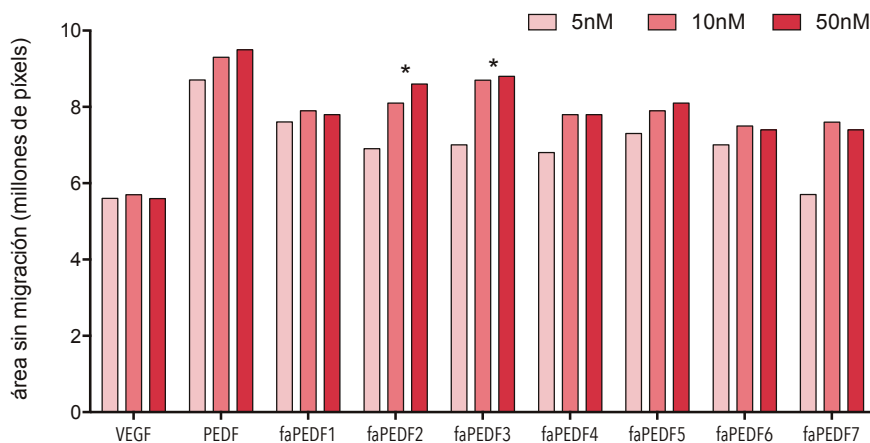
En este ensayo, las células HUVEC se trataron con las siete diferentes fracciones activas de PEDF a diferentes concentraciones (5, 10 y 50 nM) respectivamente. Todos los tratamientos fueron realizados en medio de cultivo EBM suplementado con VEGF. La migración de las células en el área de la herida se evaluó en el minuto 0 y después de 4 y 12 horas de incubación mediante toma de imágenes (figura 19 y 20). La migración de las células se cuantificó midiendo la distancia entre el borde de la herida hasta la célula más migrada en diferentes puntos (figura 21). Cada experimento se realizó 3 veces con el fin de aumentar la fiabilidad del ensayo. Las faPEDF2 y faPEDF3 inhibieron de manera estadísticamente significativa la migración celular inducida por el VEGF a concentraciones superiores a 10 nM ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19.** Migración celular sin presencia de PEDF a las 0, 4 y 12 horas (A, B y C). Las células migran hasta contactar los dos extremos. Sin embargo, cuando se añade PEDF se aprecia una mínima migración celular que ocurre tras 12 horas de exposición (D).



**Figura 20.** Diferencias en migración celular de faPEDF 50 nM a las 12h. Observamos una mayor inhibición en la migración celular con las faPEDF2 y faPEDF 3.



**Figura 21.** Efecto dosis-dependiente de las fracciones de PEDF en la migración de las células HUVEC. Las fracciones 2 y 3 mostraron una mayor inhibición de la migración de células endoteliales a concentraciones de 10 nM y 50 nM. \*  $p < 0,05$ .

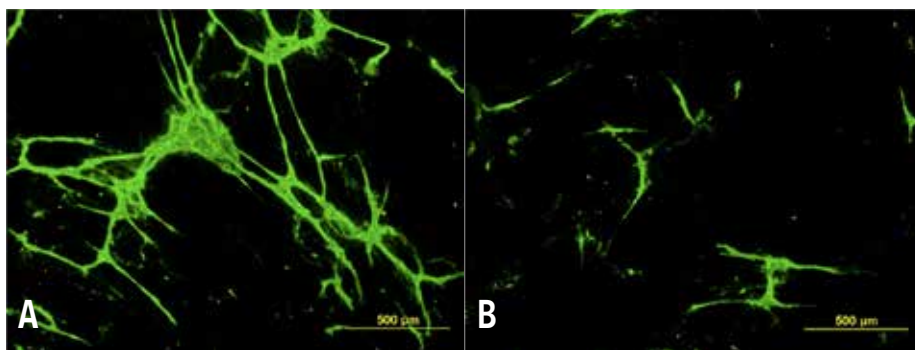
## 4.1.2 Resultados del ensayo de formación de túbulos

Las células HUVEC tienden a formar túbulos parecidos a formaciones capilares cuando se colocan en la membrana basal de una matriz de Matrigel® y se les añade VEGF, imitando los pasos que se producen durante la angiogénesis. Cuando tratamos las células HUVEC conjuntamente con las faPEDF la formación de túbulos se interrumpe y las células aparecen dispersadas en la matriz de Matrigel® (figura 22). Se testaron las distintas faPEDF para el estudio de inhibición de formación tubular, tratando las células con concentraciones desde 5 nM y aumentando progresivamente hasta 10 nM y 50 nM.

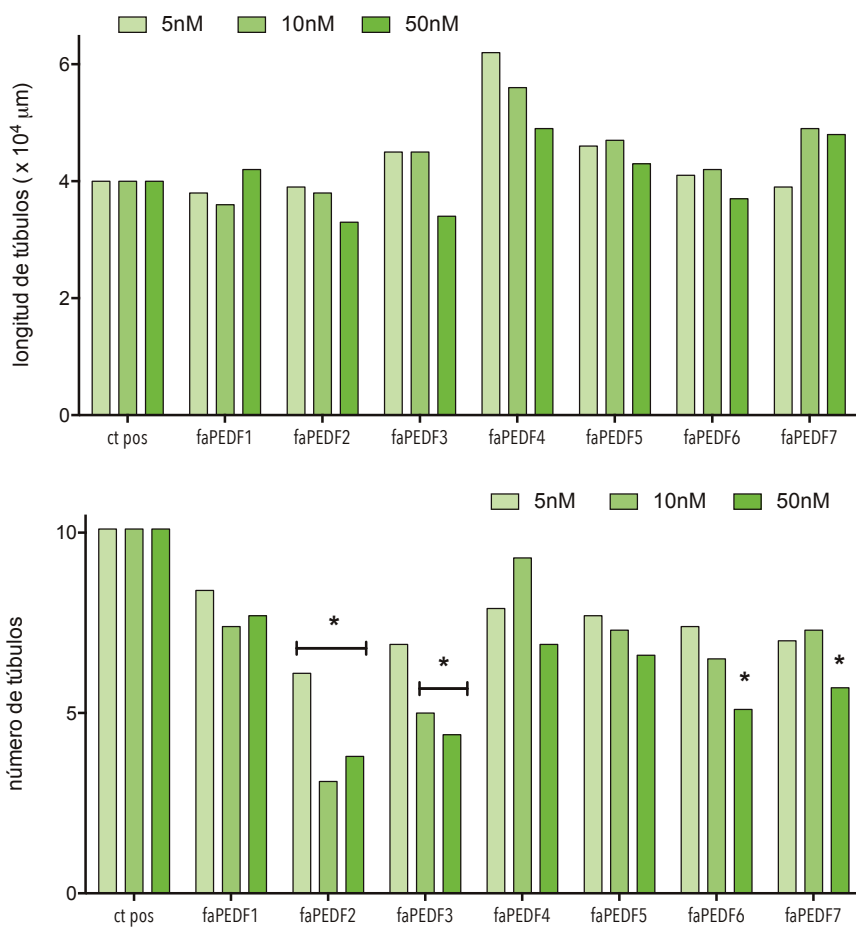
Cada experimento se realizó 3 veces con el fin de aumentar la fiabilidad del ensayo. Las faPEDF2 y faPEDF3 mostraron una disminución en la longitud de túbulos formados a partir de concentraciones de 50 nM. Sin embargo, estos resultados no alcanzaron significación estadística. La faPEDF2 se mostró efectiva en la inhibición de formación de túbulos en todas las concentraciones ( $p < 0,05$ ), pero no la faPEDF3, que sólo fue efectiva a partir de 10 nM. Las faPEDF6 y faPEDF7 sólo consiguieron buenos resultados inhibiendo la formación de túbulos a concentraciones de 50 nM ( $p < 0,05$ ) (figuras 23 y 24).

## 4.1.3 Resultados del ensayo de exclusión con azul tripán

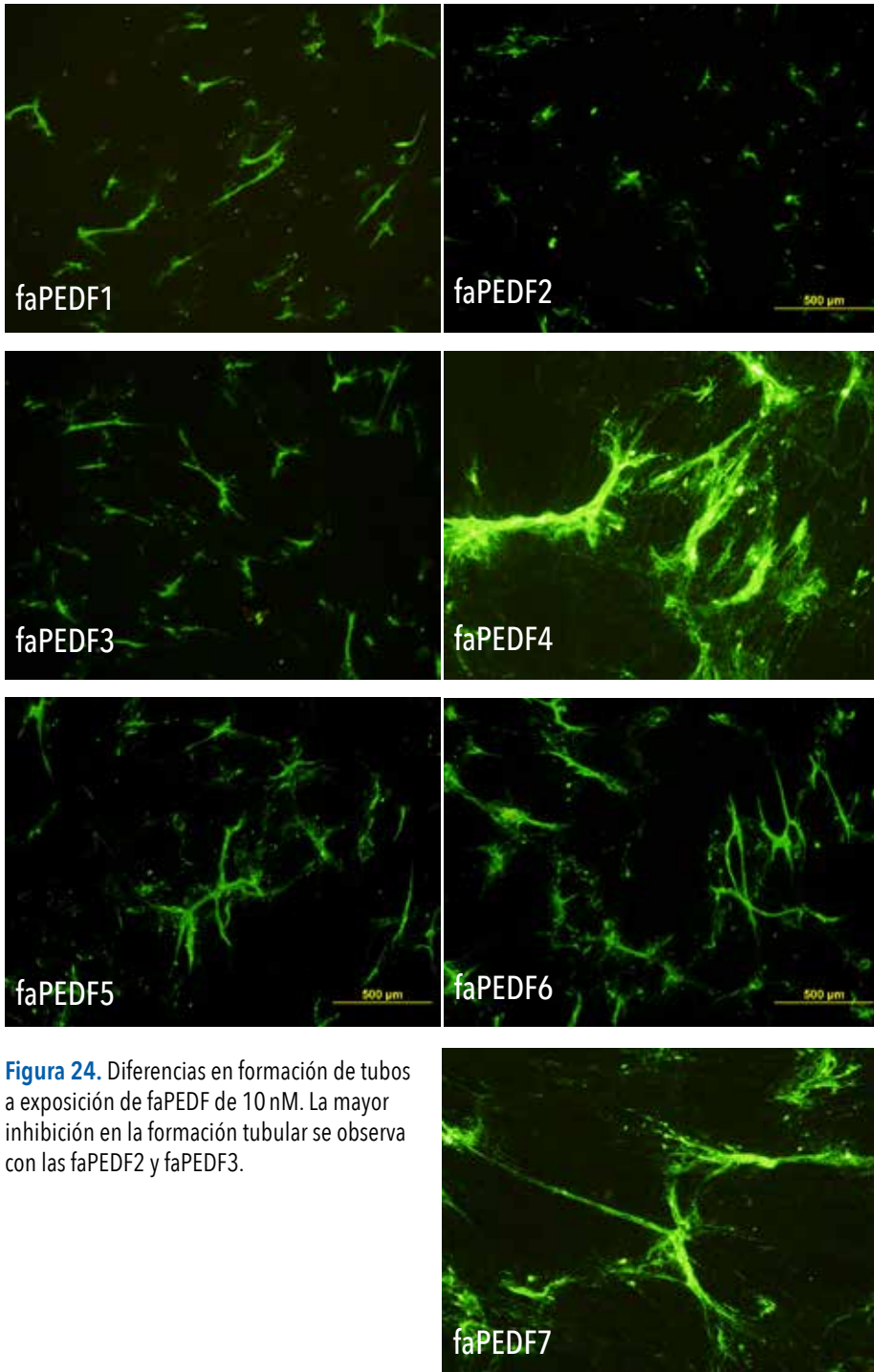
En este ensayo se evaluó la eficacia inhibitoria de las faPEDF sobre el efecto de supervivencia celular que genera el VEGF a diferentes concentraciones (5 nM, 10 nM y 50 nM). Cada experimento se realizó 3 veces con el fin de aumentar la fiabilidad del ensayo. Las células HUVEC fueron tripsinizadas y la viabilidad ce-



**Figura 22.** Ensayo de formación tubular. Las células HUVEC tienden a formar túbulos cuando son co-cultivadas con VEGF (A). Observamos la ausencia de formación tubular cuando son co-cultivadas con VEGF y PEDF (B).

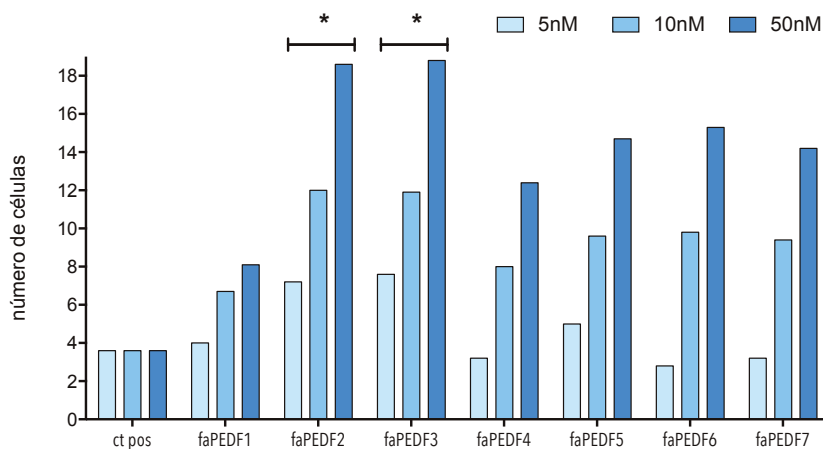


**Figura 23.** Ensayo de formación tubular. Las faPEDF2 y faPEDF3 mostraron efecto en disminuir la longitud tubular a partir de una concentración de 50 nM. La faPEDF2 también mostró efecto inhibiendo la formación de tubos en todas las concentraciones.



**Figura 24.** Diferencias en formación de tubos a exposición de faPEDF de 10 nM. La mayor inhibición en la formación tubular se observa con las faPEDF2 y faPEDF3.

lular se determinó realizando un conteo de las células teñidas de azul (no viables) y de las células brillantes (viables) tras realizar la tinción con azul tripán al 0,2% . El efecto observado de inhibición de la viabilidad celular mediante el tratamiento con las distintas faPEDF fue dosis dependiente. Cuando las HUVEC fueron incubadas con faPEDF a una concentración de 5 nM, las fracciones faPEDF2 y faPEDF3 abolieron completamente los efectos de supervivencia celular mediada por VEGF comparada con otras faPEDF y alcanzaron significación estadística ( $p < 0,05$ ) (figura 25).



**Figura 25.** Ensayo de viabilidad celular mediante exclusión por tinción con azul tripán. A concentraciones de 5 nM, las faPEDF2 y faPEDF3 mostraron una inhibición completa de la supervivencia celular mediada por VEGF.





# 4.2

## Resultados Experimentos *in vivo*

---

La primera fase de los experimentos *in vivo* fue realizada con el objetivo de determinar la reproducibilidad de la técnica de realización de las lesiones mediante láser verde de 532 nm y la caracterización de la evolución del modelo de NVC para la posterior utilización en el estudio del efecto del colirio faPE-DF3. Los animales utilizados en todos los procedimientos de este experimento *in vivo* fueron ratones C57BL/6N de 6 a 12 semanas de edad y fueron realizados utilizando anestesia inhalada.

### 4.2.1 Modelo animal de neovascularización coroidea

Para el desarrollo del modelo de NVC se dividió el ensayo en 3 fases. Una primera fase donde se realizó la fotocoagulación con láser verde de 532 nm, la segunda fase que incluyó los estudios de seguimiento *in vivo* mediante angiografía fluoresceínica y electroretinograma focal, y la última fase donde se realizaron los estudios *post mortem* que incluyeron la inmunofluorescencia en *flatmount* y la extracción de RNA de retina para análisis de expresión génica mediante q-PCR. La cantidad de ratones C57BL/6N y la distribución por grupos se encuentra en el apartado de material y métodos resumido en el esquema de la figura 12.

#### 4.2.1.1 Fotocoagulación mediante láser verde 532 nm

Las condiciones del láser se establecieron a 250 mW de intensidad y 100 ms de duración, con un tamaño de *spot* de 50  $\mu\text{m}$ . Estas condiciones se encontraban dentro del rango de parámetros recomendados por el fabricante del equipo Micron III (Phoenix Research Labs, Pleasanton CA, USA). Previamente, se desarrollaron diferentes estudios para testar los parámetros de láser en referencia a potencia,

duración de impacto y *spot* para determinar cuáles eran los más óptimos y por lo tanto aptos para ser utilizados en nuestro modelo animal.

Se probaron todas las combinaciones de parámetros que incluían potencias de entre 100-1000 mW, duraciones de impacto de entre 50-200 ms y tamaños de *spot* entre 50 y 75  $\mu\text{m}$ . Inicialmente el método utilizado en los primeros ensayos fue un oftalmoscopio indirecto con un láser verde de 532 nm incorporado y una lente de 90 dioptrías (figuras 26 y 27). Posteriormente se adquirió el equipo Micron III (figura 28) que fue el que se utilizó para el desarrollo de todo el ensayo con los parámetros previamente descritos. El objetivo era provocar una rotura de la membrana de Bruch para provocar la aparición de NVC (figura 29). Se realizaron 4 lesiones de distribución peripapilar en cada animal.

#### 4.2.1.2 Angiografía fluoresceínica

Se realizó angiografía fluoresceínica en diferentes tiempos: 2,4,7,9,11 y 14 días post-láser (figura 30). En cada prueba se tomaron fotos de las lesiones realizadas y se cuantificó su evolución midiendo el área de cada una de las 40 lesiones creadas.

Se observó que durante los primeros días (2 a 4 días) existió una reducción en el tamaño de las lesiones, seguramente atribuida a una disminución en la inflamación. Seguidamente, entre los 4 y 7 días, se observó un incremento de tamaño de estas lesiones que seguramente fue debido a la aparición de neovasos (figura 31). A partir de ese momento las áreas de lesión se estabilizaron y no aumentaron más debido al proceso de cicatrización, a pesar de que el proceso de neovascularización pudiera estar también evolucionando.



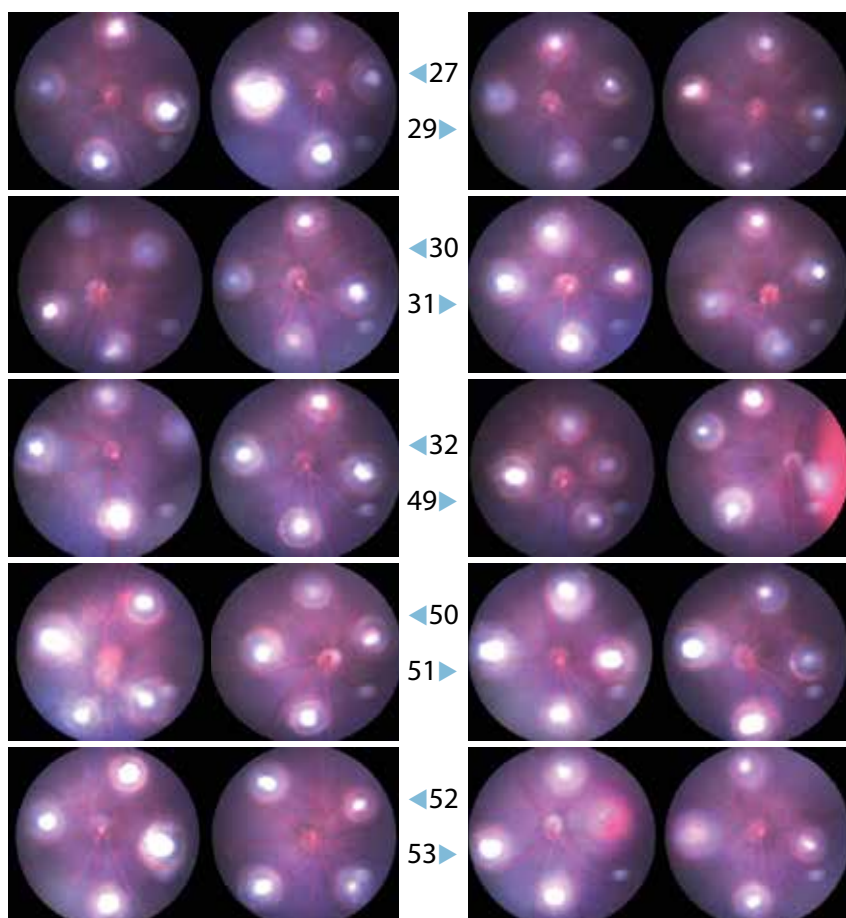
**Figura 26.** Desarrollo del modelo animal de NVC. En las fases iniciales el método utilizado para realizar la rotura de la membrana de Bruch fue utilizando un oftalmoscopio indirecto con un láser verde de 532 nm integrado y una lente de 90 dioptrías.



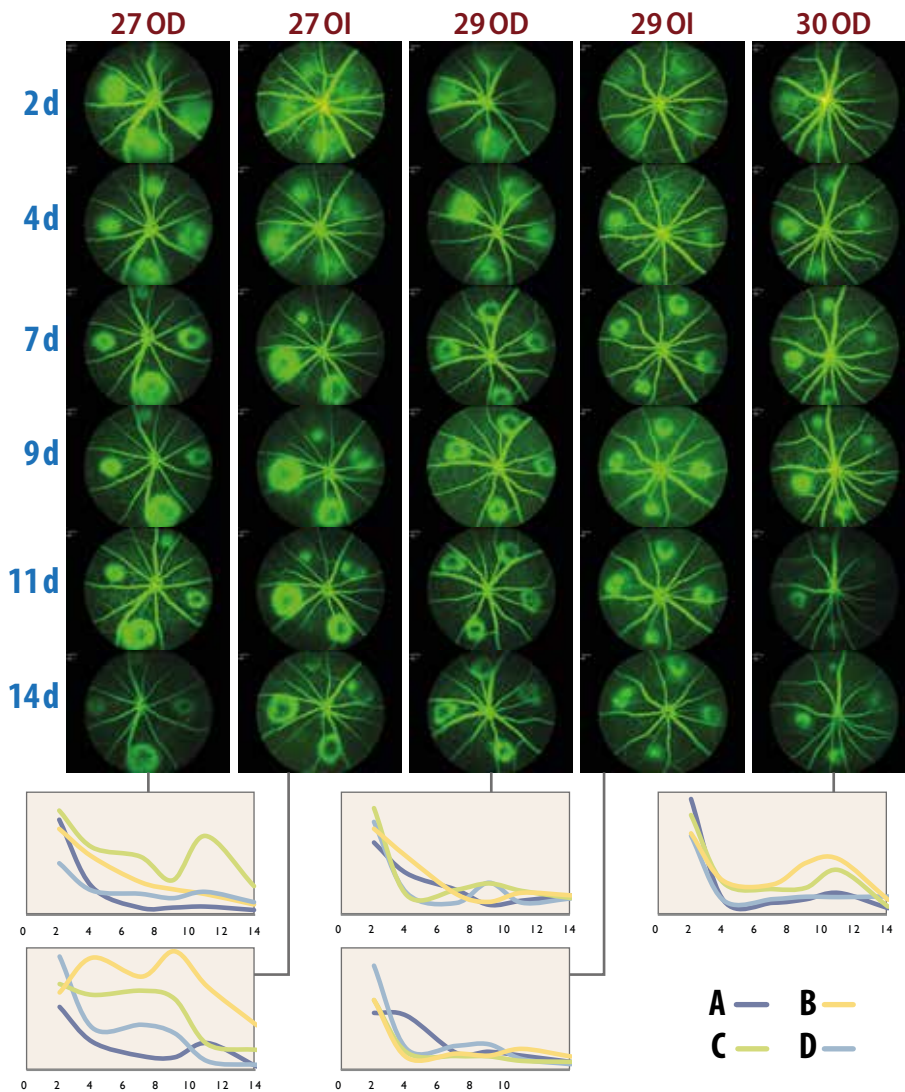
**Figura 27.** Visualización externa de la NVC creada en el ratón C57BL/6N.



**Figura 28.** Micron III para realización de NVC. Este sistema permite realizar los impactos de láser guiados por imagen y con un sistema de contacto.



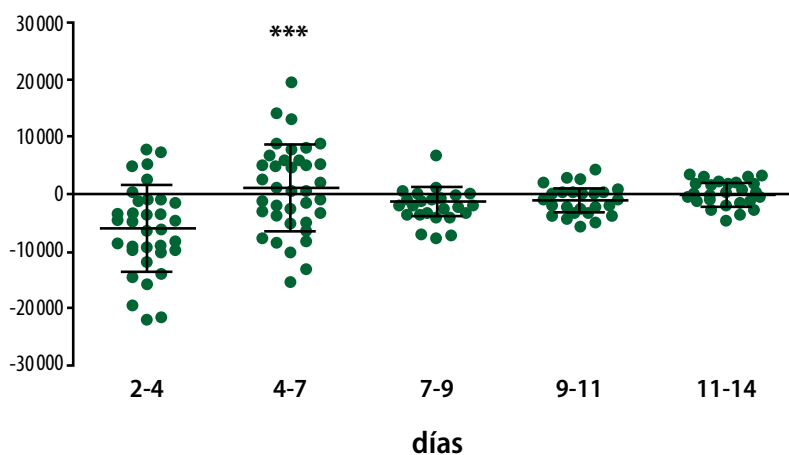
**Figura 29.** Impactos de láser en la retina de ratones C57BL/6N de 6 a 12 semanas de edad. La potencia del láser se estableció en 250 mW de intensidad, 100 ms de duración y tamaño de spot de 50  $\mu\text{m}$ . Se realizaron 4 impactos de distribución peripapilar en cada animal. En algunos casos observamos hemorragia debido al impacto del láser en algún vaso sanguíneo. Ojos derecho e izquierdo para cada animal (se indica el número del individuo).



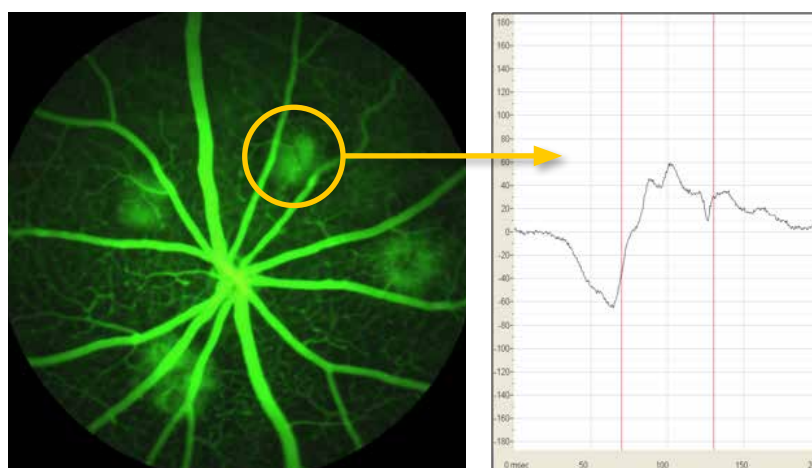
**Figura 30.** Análisis de la evolución de las lesiones mediante angiografía fluoresceínica. Las curvas de cuantificación muestran la evolución de cada lesión a lo largo del seguimiento los días 2,4,7,9,11 y 14.

### 4.2.1.3 Electrorretinograma focal

Se realizó fERG en 10 animales los días 7 y 14 post-láser, previa adaptación a la oscuridad. Medimos la amplitud de las ondas a y b (figura 32) expresada en microvoltios que son indicativas de la actividad de las distintas capas de la retina. Se midió también el tiempo implícito, que es indicativo de la rapidez de la respuesta y por lo tanto del estado de la retina. Se realizaron lecturas en tres intensidades de

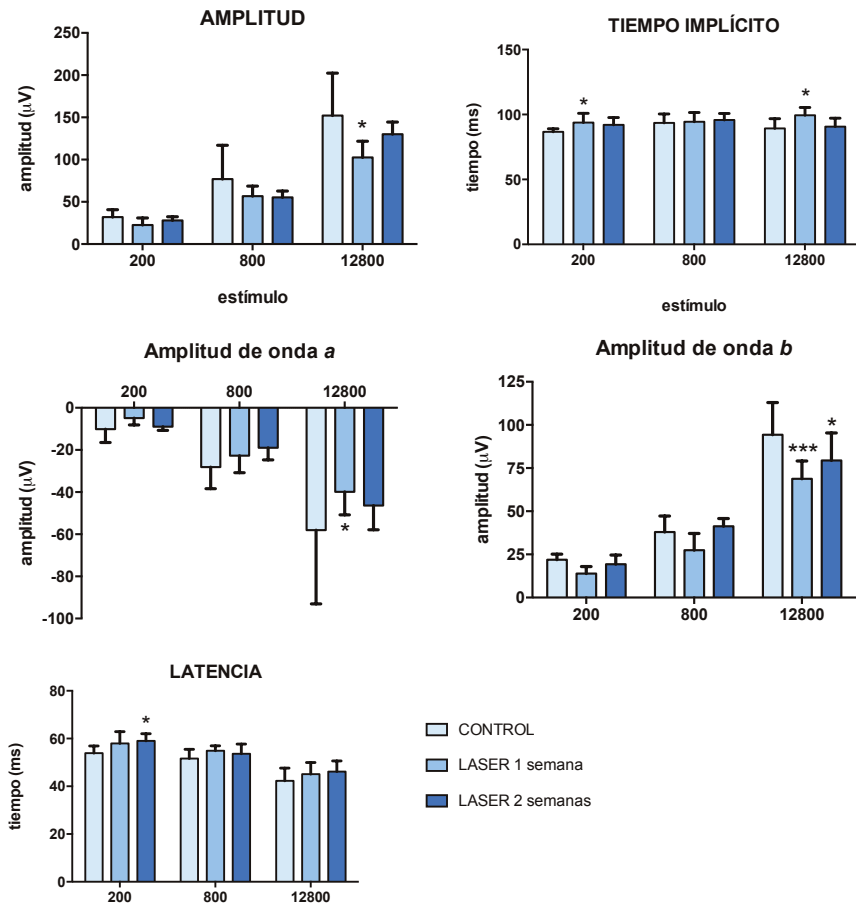


**Figura 31.** Análisis de la evolución de las lesiones mediante angiografía fluoresceínica. Se observa el mayor incremento del tamaño de las lesiones en el período comprendido entre los días 4 y 7 debido a la aparición de neovasos.



**Figura 32.** Ejemplo de medición de las ondas a, b y tiempo de latencia de una NVC creada mediante láser en FERG.

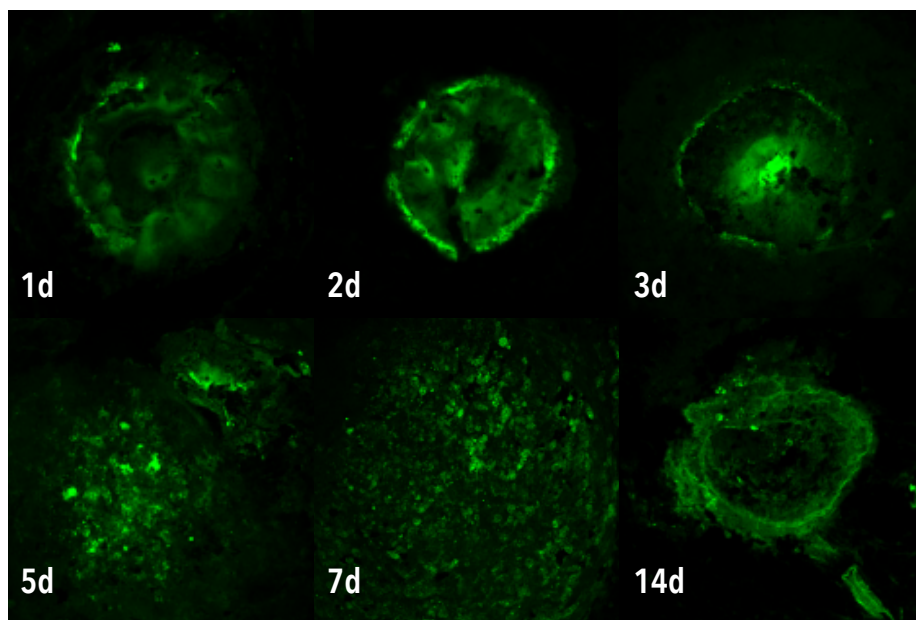
luz diferentes: 200, 800 y 12800 cd.s/m<sup>2</sup>. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) a 1 semana post-láser, comparando con los animales control. Se observó una reducción en la amplitud de las ondas a y b y un aumento del tiempo implícito, indicativo de un mal funcionamiento de la retina (figura 33).



**Figura 33.** Análisis de la función visual mediante fERG. Se observa disminución en la amplitud de las ondas a y b junto con un aumento del tiempo implícito la primera semana post-láser.

#### 4.2.1.4 Inmunofluorescencia en "flatmount"

Los grupos de animales fueron sacrificados a diferentes tiempos post-láser para poder analizar *post mortem* la evolución de la formación de neovasos provocados por las lesiones. Se analizaron a los 1, 2, 3, 5, 7 y 14 días post-láser. La detección de isolectina B-4 determinó las zonas lesionadas en las que había células endoteliales de tal forma que se estudió la aparición de neovasos. En el análisis cualitativo se observó una señal inespecífica en los márgenes de la lesión en las muestras correspondientes a los 2 y 3 días post-láser, posiblemente siendo consecuencia de la propia inflamación. Entre los días 3 y 5 se observan indicios de células endoteliales en forma de punto en el centro de la lesión. Finalmente a partir del día 7 y sobre todo a partir del día 14 se observaron estructuras tubulares que correspondían a los neovasos apareciendo en los extremos de las lesiones (figura 34).



**Figura 34.** Estudio de inmunofluorescencia en *flatmount*. Los 3 primeros días tras la inducción de la lesión mediante láser verde se observan señales inflamatorias inespecíficas en el margen de la lesión. A partir del día 5 aparecen spots centrales que evolucionaron a estructuras tubulares correspondientes a los neovasos.

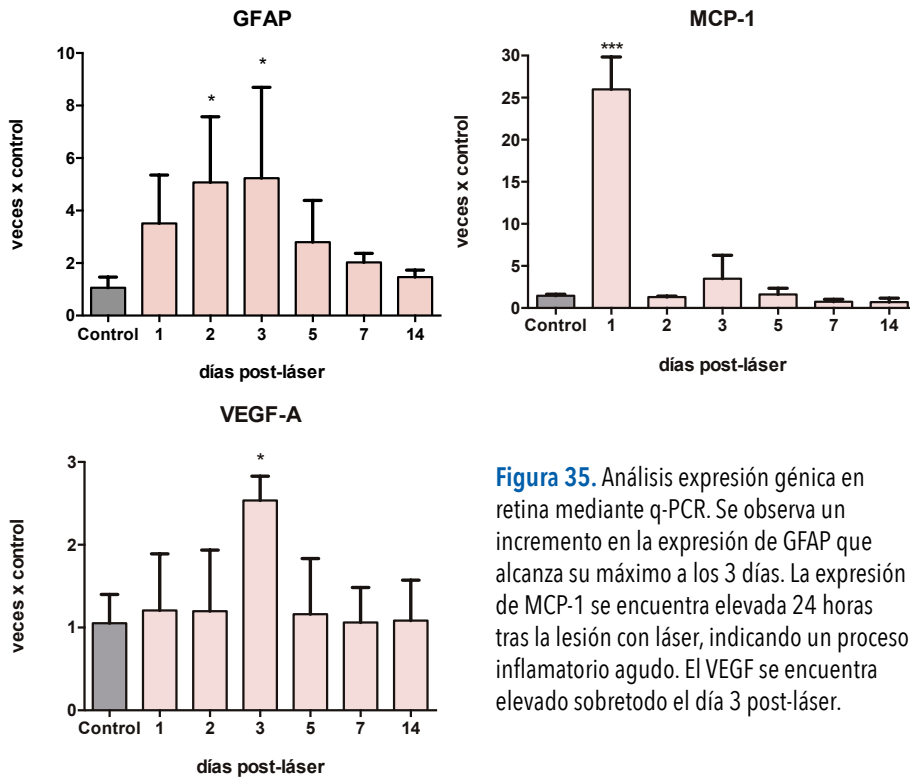
#### 4.2.1.5 Extracción de RNA de retina y análisis de expresión génica mediante q-PCR

Los grupos de animales fueron sacrificados a diferentes tiempos post-láser para poder analizar *post mortem* la evolución de la formación de neovasos provocados por las lesiones. Se analizaron a 1, 2, 3, 5, 7 y 14 días post-láser. En este caso se aisló el tejido retiniano para extracción de RNA. El RNA obtenido se retrotranscribió a DNAc y se analizó la expresión de diferentes genes mediante q-PCR, comparándolo con la expresión génica de retinas control sin lesiones.

La primera proteína de la que se estudió su expresión fue la proteína fibrilar ácida de la glía, también denominada proteína gliofibrilar ácida (GFAP). Es una proteína específica de los filamentos intermedios del citoesqueleto de células gliales que les confiere el mantenimiento de su estructura tridimensional. Esta proteína se debería encontrar sobreexpresada tras la lesión con láser en el tejido retiniano. Se observó un incremento en la sobreexpresión de GFAP a las 24 horas tras la lesión inducida con láser en comparación con el grupo control, alcanzando significación estadística con su nivel máximo de expresión a los 3 días; y de nuevo disminuyendo hasta normalizar sus niveles el día 14.

Se analizó la expresión de la proteína MCP-1 relacionada con los procesos inflamatorios. Esta proteína se expresa en las células del EPR y en células endoteliales

y actúa como quimiocina atrayente de monocitos. Se encontró significativamente elevada su expresión el primer día post-láser. Finalmente, se analizó la sobreexpresión de VEGF tras la inducción con láser, siendo uno de los principales agentes angiogénicos causantes de la NVC. Se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de VEGF el día 3 post-láser (figura 35).



**Figura 35.** Análisis expresión génica en retina mediante q-PCR. Se observa un incremento en la expresión de GFAP que alcanza su máximo a los 3 días. La expresión de MCP-1 se encuentra elevada 24 horas tras la lesión con láser, indicando un proceso inflamatorio agudo. El VEGF se encuentra elevado sobretodo el día 3 post-láser.

## 4.2.2 Administración tópica del tratamiento

Se estudió el efecto del colirio faPEDF en un modelo de NVC desarrollado previamente. La faPEDF3 es la que mostró más actividad antiangiogénica en los estudios *in vitro* realizados previamente, así que se comparó un tratamiento A compuesto de faPEDF3 1 mg/ml, un tratamiento B compuesto de faPEDF3 10 mg/ml y finalmente un tratamiento C placebo. Es importante destacar que hasta después de haberse analizado todos los datos y concluido el experimento los investigadores no conocieron qué fármaco ni a qué concentración se encontraba en ninguno de los 3 grupos. Esta metodología fue utilizada para prevenir que los resultados de la investigación pudieran estar influidos por el sesgo del observador. Para el desarrollo de esta fase se dividió el ensayo en 3 fases. Una primera fase donde se realizó la fotocoagulación con láser verde de 532 nm, la segunda fase que



incluyó los estudios de seguimiento *in vivo* mediante angiografía fluoresceínica y la última fase donde se realizaron los estudios *post mortem* que incluyeron la inmunofluorescencia en *flatmount* y la extracción de RNA de retina para análisis de expresión génica mediante q-PCR. La cantidad de ratones C57BL/6N y la distribución por grupos se encuentra en el apartado de material y métodos resumido en el esquema de la figura 17.

#### 4.2.2.1 Fotocoagulación mediante láser verde 532 nm

Los parámetros de láser para realizar la NVC se establecieron en una potencia de 250 mW, el tiempo de duración del impacto en 100 ms y un *spot* de 50  $\mu\text{m}$  (figura 36). Estos parámetros fueron establecidos según los resultados obtenidos en el estudio previo de desarrollo de modelo animal de NVC y que permitieron romper la membrana de Bruch para que apareciera la NVC.

En los grupos utilizados posteriormente para realización de inmunofluorescencia se realizaron lesiones en 4 puntos de disposición peripapilar (3, 6, 9 y 12 siguiendo la disposición de las horas del reloj). Sin embargo, en los grupos utilizados posteriormente para extracción de RNA, el número de lesiones fue superior (entre 6 y 8), siguiendo también la misma disposición peripapilar. Esto se realizó con el fin de aumentar la muestra poblacional y por consiguiente incrementar la fiabilidad de los resultados en el estudio de expresión génica mediante q-PCR.

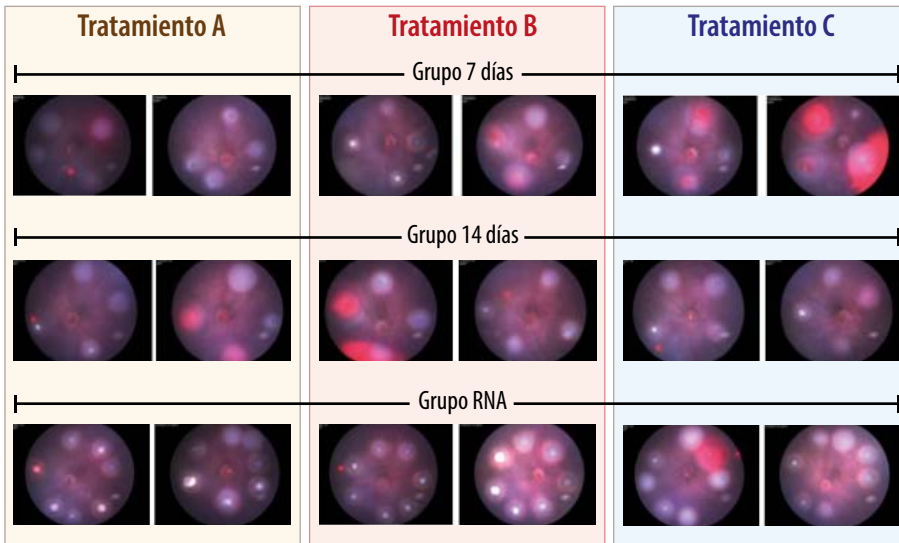
#### 4.2.2.2 Angiografía fluoresceínica

Se realizó angiografía fluoresceínica en diferentes tiempos según el grupo de tratamiento: 3, 7 o 14 días post-láser. En cada prueba se tomaron fotos de las lesiones realizadas y permitió observar las lesiones y relacionarlas con la rotura de la membrana de Bruch provocada por el láser (figura 37). Las áreas lesionadas observables a través de la angiografía fluoresceínica se cuantificaron a 7 y 14 días post-láser (figura 38), puesto que en los estudios previos de desarrollo del modelo de NVC mostraron un incremento del tamaño de la lesión a partir del día 7.

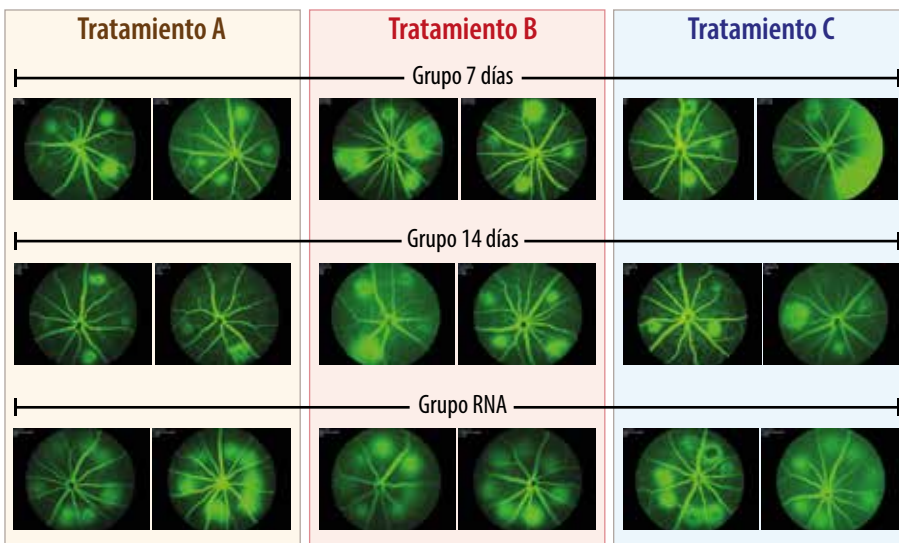
En el análisis a los 7 días no se observaron diferencias entre los 3 grupos de tratamiento. Sin embargo, a los 14 días de haber generado la lesión con láser los ojos tratados con los colirios A y B (faPEDF3 1 mg/ml y faPEDF3 10 mg/ml respectivamente) presentaron una reducción estadísticamente significativa de las áreas de neovascularización subretiniana comparados con el placebo (figura 39).

#### 4.2.2.3 Inmunofluorescencia en "flatmount"

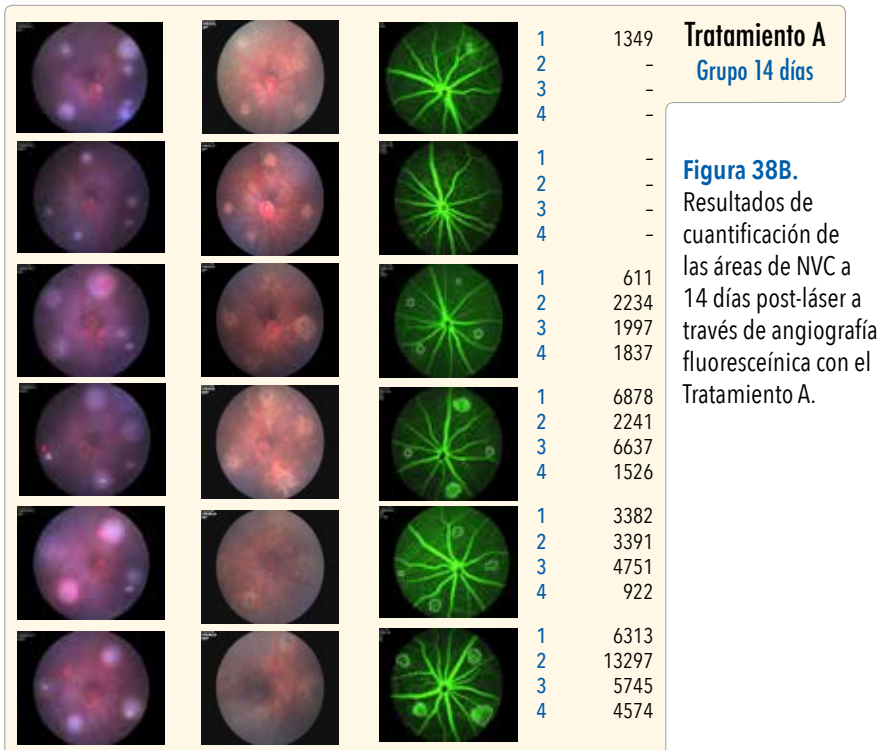
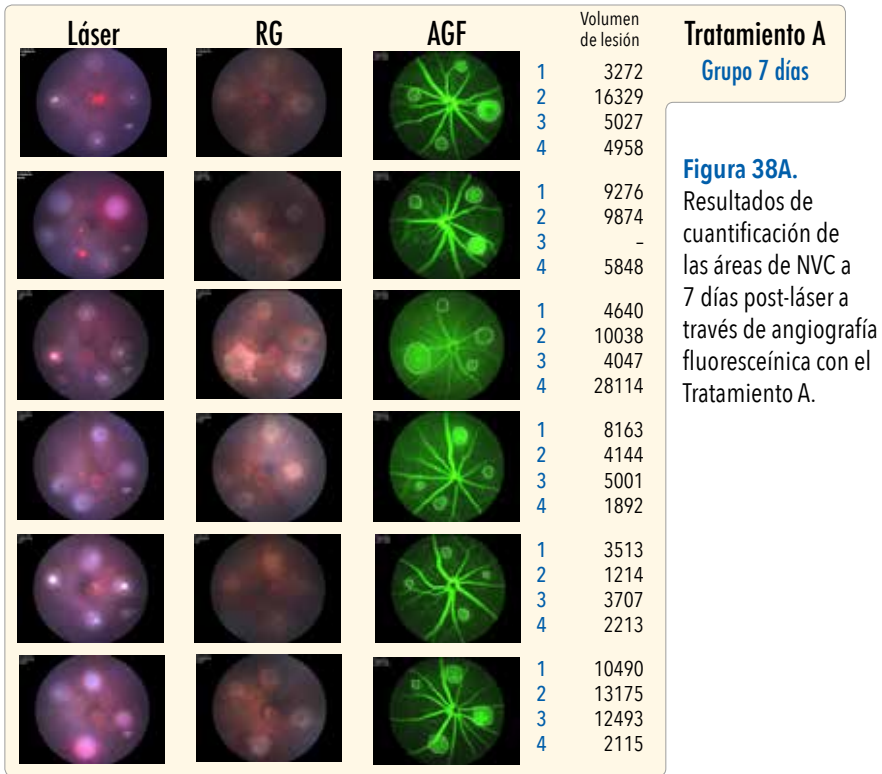
La detección de isolectina B-4 determinó las áreas de zonas lesionadas en las que había células endoteliales. Con esta metodología se pudo comparar cuantitativamente



**Figura 36.** Imágenes representativas de retina en el momento de realizar la lesión con láser para provocar la NVC. Se observa como en el grupo RNA se realizan entre 6 y 8 lesiones de distribución peripapilar.



**Figura 37.** Imágenes representativas de angiografía fluoresceínica en los 3 grupos de tratamiento a diferentes días post-inducción de la NVC mediante láser verde.

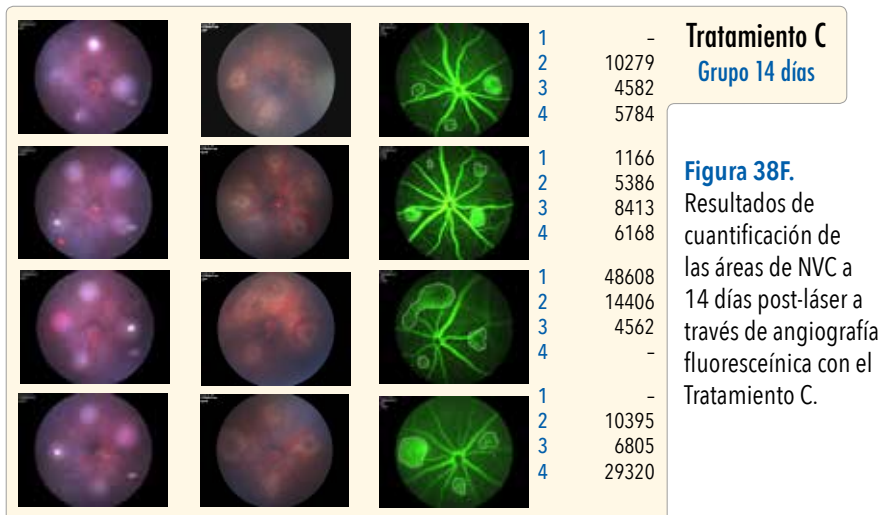
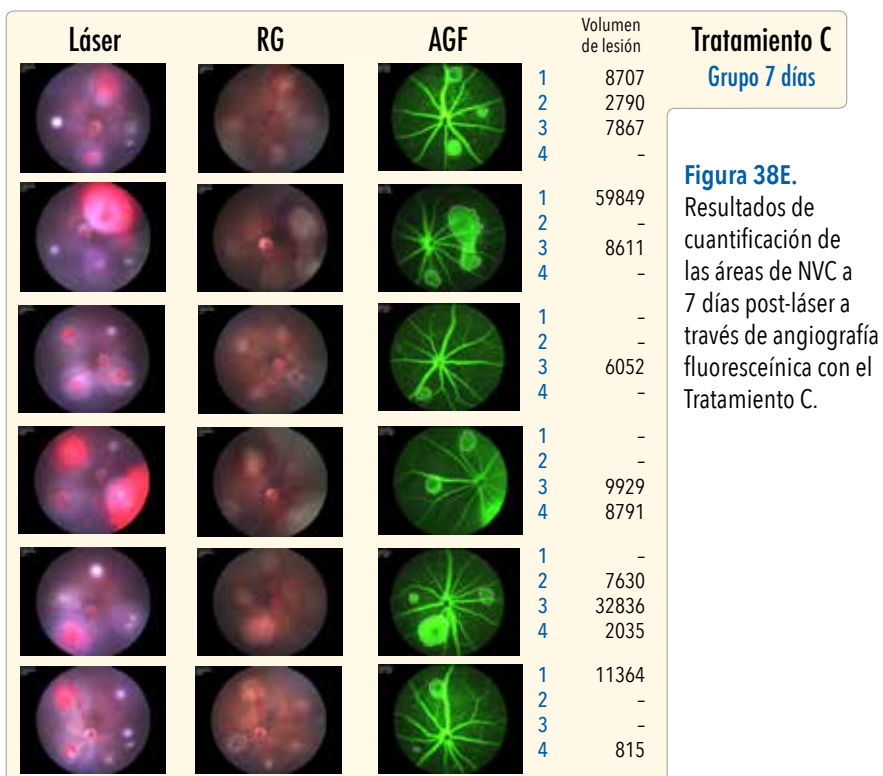


**Figura 38C.**  
Resultados de cuantificación de las áreas de NVC a 7 días post-láser a través de angiografía fluoresceínica con el Tratamiento B.

Tratamiento B Grupo 7 días		Láser	RG	AGF		Volumen de lesión
1	2				1	7865
					2	47752
					3	10593
					4	33706
1	2				1	-
					2	-
					3	17931
					4	-
1	2				1	16202
					2	2124
					3	8966
					4	6284
1	2				1	6477
					2	38852
					3	3521
					4	-
1	2				1	9825
					2	3572
					3	5833
					4	1068
1	2				1	5333
					2	8025
					3	8531
					4	8160

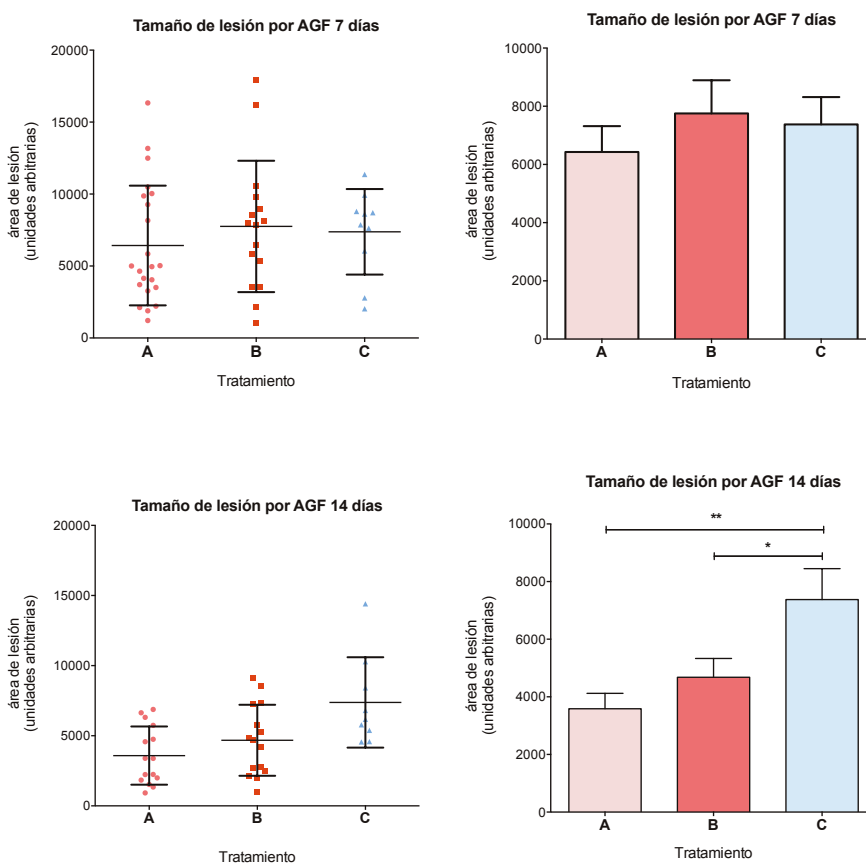
**Figura 38D.**  
Resultados de cuantificación de las áreas de NVC a 14 días post-láser a través de angiografía fluoresceínica con el Tratamiento B.

Tratamiento B Grupo 14 días		Láser	RG	AGF		Volumen de lesión
1	2				1	-
					2	7290
					3	4232
					4	-
1	2				1	5280
					2	4675
					3	29401
					4	12436
1	2				1	2021
					2	-
					3	14445
					4	4658
1	2				1	2118
					2	50788
					3	-
					4	1014
1	2				1	9094
					2	2792
					3	2481
					4	5770
1	2				1	7359
					2	4838
					3	8527
					4	2677



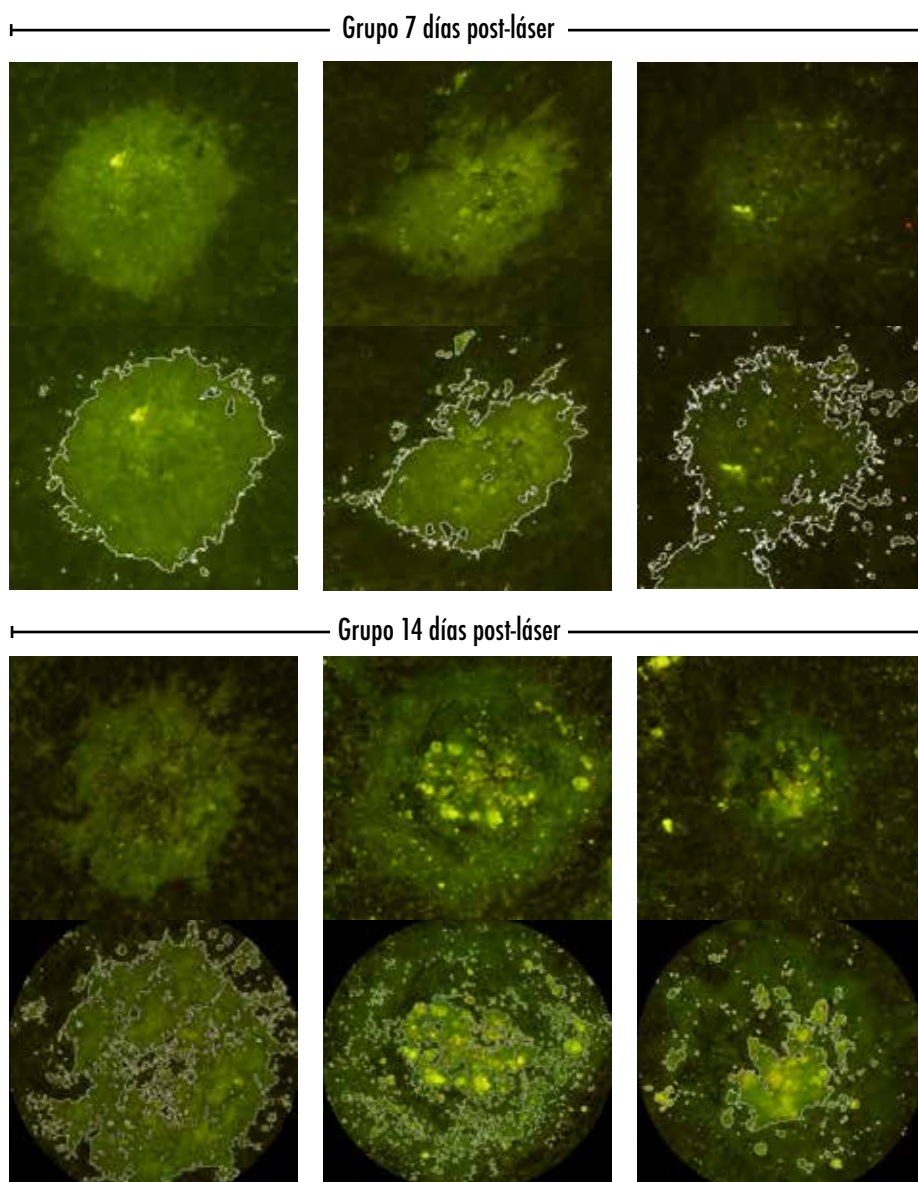
la medida de las lesiones después de tratar a los ratones C57BL/6N con los diferentes colirios A, B y C (figura 40) utilizando el software de imagen Image J. En los estudios realizados previamente para diseñar el modelo experimental de NVC en ratones C57BL/6N fue entre los días 3 y 5 post-láser cuando se empezó a observar indicios de células endoteliales en forma de punto en el centro de la lesión.

A partir del día 7 y sobretodo en el día 14 post-láser fue cuando se observaron estructuras tubulares que corresponden a los neovasos apareciendo en los extremos de las lesiones. Por ese motivo, el análisis de cuantificación de neovasos en ratones C57BL/6N tratados con colirio se realizó el día 7 y el día 14 post-láser. El área de neovasos formados en los ojos tratados con el colirio A (faPEDF3



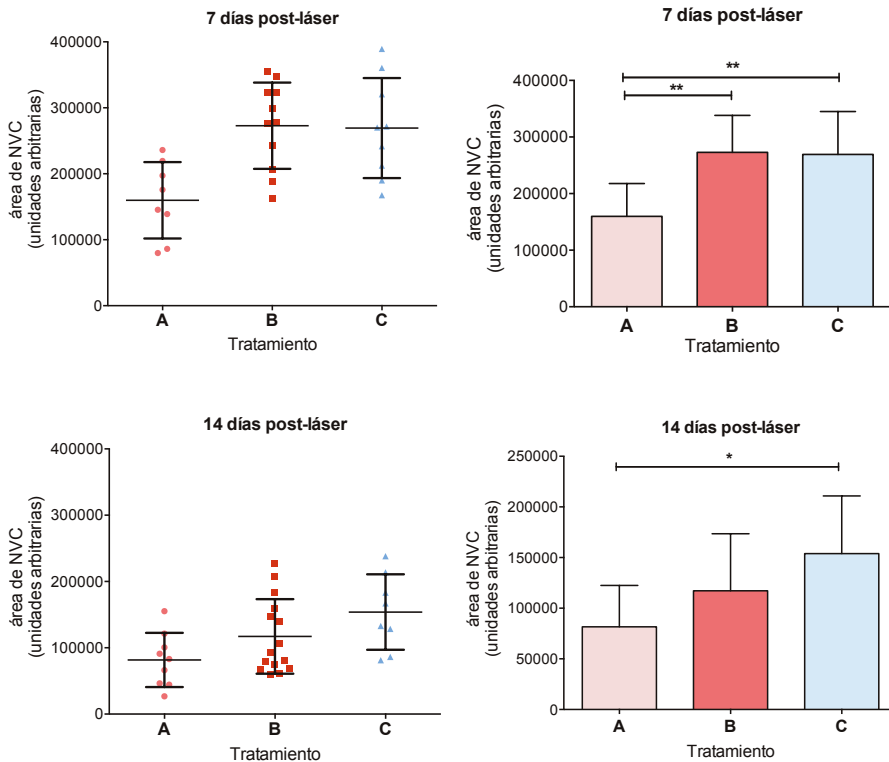
**Figura 39.** Cuantificación de áreas de NVC a 7 y 14 días post-láser a través de angiografía fluoresceínica. No se observaron diferencias entre los tres grupos de tratamiento a los 7 días. A los 14 días se observa una disminución significativa del tamaño de las lesiones con los grupos de tratamiento A y B (faPEDF3 1 mg/ml y 10 mg/ml) en comparación con el grupo C (placebo). Los datos se han procesado mediante ANOVA univariante y se han comparado mediante Bonferroni's Multiple-Comparison Test.

1 mg/ml) fue significativamente más pequeña tanto a los 7 días como a los 14 días post-láser cuando la comparamos con el área de neovasos formados en los ojos tratados con el colirio C (placebo). Además, también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el área de formación de neovasos de los animales tratados con el colirio A en comparación con el colirio B (faPEDF3



**Figura 40.** Detección de isolectina-B4 a través de inmunofluorescencia, mostrando la zona donde se forman las células endoteliales que darán lugar a la formación de neovasos. La línea blanca delimita el área de formación de neovasos para su análisis cuantitativo.

10 mg/ml) a los 7 días post-láser, siendo siempre menor la proliferación de neovasos en los animales tratados con el colirio A. Sin embargo, estas diferencias entre ambos no alcanzaron la significación estadística a los 14 días (figura 41).



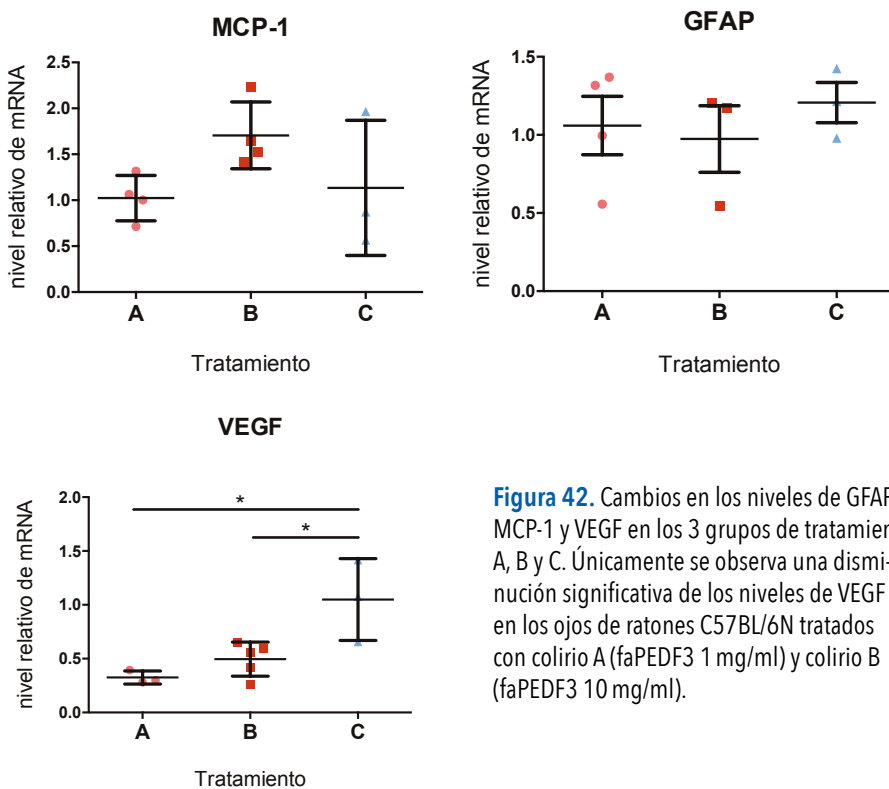
**Figura 41.** Cuantificación de las áreas de formación de neovasos a los 7 y 14 días post-láser a través de inmunotinción mediante isolectina-B4. Los ratones C57BL/6N tratados con el colirio A (faPEDF3 1 mg/ml) muestran significativamente menos área de neovascularización cuando se compara con el área de neovascularización formada en los ratones C57BL/6N tratados con el colirio B (faPEDF3 10 mg/ml) y colirio C (placebo) a los 7 días. A los 14 días las diferencias observadas entre A y B no son estadísticamente significativas.

#### 4.2.2.4 Extracción de RNA de retina y análisis de expresión génica mediante q-PCR

El RNA obtenido a partir del aislamiento de los ojos tratados con colirio A, B y C (grupo RNA) se retrotranscribió a DNAc y se analizó la expresión de diferentes genes mediante q-PCR, comparándolo con la expresión génica de retinas control sin lesiones provocadas con el láser y que también recibieron tratamiento. La primera proteína de la que se estudió su expresión fue la GFAP. Esta proteína se debería encontrar sobreexpresada tras la lesión con láser en el tejido retiniano. También se analizó la expresión de la proteína MCP-1 relacionada con los procesos inflamatorios y la sobreexpresión de VEGF tras la inducción con láser.



Por los resultados obtenidos mediante el análisis de expresión génica en los estudios de diseño experimental de NVC en ratones C57BL/6N, se definió el día 3 como el momento óptimo para analizar la expresión de GFAP, MCP-1 y VEGF. No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de GFAP y MCP-1 entre los tratamientos A, B y C. Sin embargo, a diferencia de estos dos genes, sí que se observó una disminución significativa de la expresión de VEGF en los ojos de ratones C57BL/6N tratados con colirio A (faPEDF3 1 mg/ml) y colirio B (faPEDF3 10 mg/ml) y no en aquellos tratados con colirio C (placebo), lo cual sugiere una disminución del proceso de neovascularización en esos dos grupos de tratamiento (figura 42).



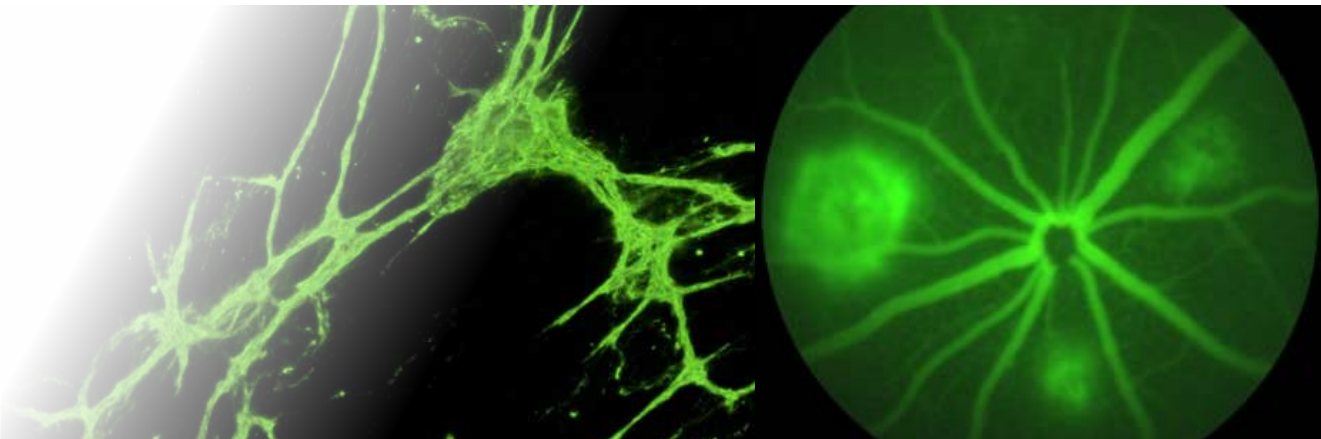
**Figura 42.** Cambios en los niveles de GFAP, MCP-1 y VEGF en los 3 grupos de tratamiento A, B y C. Únicamente se observa una disminución significativa de los niveles de VEGF en los ojos de ratones C57BL/6N tratados con colirio A (faPEDF3 1 mg/ml) y colirio B (faPEDF3 10 mg/ml).



# *Discusión*

## 5

- 5.1 Discusión sobre el diseño del ensayo
- 5.2 Discusión sobre modelo animal de DMAE exudativa utilizado
- 5.3 Discusión sobre la forma de administración farmacológica
- 5.4 Discusión de los resultados "in vitro"
- 5.5 Discusión de los resultados "in vivo"
- 5.6 Conclusiones





# 5.1

## Discusión Sobre el diseño del ensayo

---

El objetivo esencial de este estudio fue evaluar la eficacia de la administración de una fracción activa de PEDF sintética por vía tópica con el fin de determinar una nueva vía terapéutica para la NVC secundaria a DMAE. Sabemos que la progresión de la DMAE exudativa depende de la disregulación entre factores pro- y anti-angiogénicos. Se ha observado una disminución en la expresión de PEDF en pacientes con DMAE<sup>38</sup> y una disminución de su concentración en el vítreo de pacientes con NVC<sup>39</sup>. Esta disregulación en el equilibrio entre VEGF y PEDF es la principal responsable de la formación de nuevos vasos sanguíneos aberrantes durante el desarrollo de la DMAE.<sup>40,41</sup>

Yamagishi *et al.* publicaron en 2005 que un polimorfismo genético rs1136287 en el gen que codifica para el PEDF era un claro factor de riesgo para desarrollar DMAE seca.<sup>250</sup> Sin embargo, una reciente revisión sistemática y meta-análisis publicado en la literatura sugiere que ese polimorfismo genético incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad en la población taiwanesa y coreana pero no se ha observado un mayor riesgo en la población general.<sup>251</sup>

El PEDF es la sustancia endógena intraocular (50 kDa) que posee la mayor capacidad antiangiogénica conocida.<sup>46</sup> Los tratamientos disponibles actualmente para la forma exudativa de degeneración macular son el ranibizumab (48 kDa, bloquea la isoforma VEGF-A), bevacizumab (149 kDa, bloquea la isoforma VEGF-A), pegaptanib (50 kDa, bloquea la isoforma VEGF145) y aflibercept (97 kDa, bloquea isoforma VEGF-A y el factor de crecimiento placentario). Disminuyendo la longitud de la cadena de aminoácidos pero manteniendo su capacidad antiangiogénica pensamos obtener una fracción activa de PEDF más pequeña y con menos peso molecular que permita una mejor absorción y una mayor biodisponibilidad en la retina y, por consiguiente, un potente efecto antiangiogénico. Especialmente si el

fármaco es administrado de forma tópica aumenta el sentido que sea una molécula más pequeña y modificada específicamente para que facilite la absorción y sea más efectiva en el tejido retiniano. Además, los tratamientos que disponemos actualmente para el tratamiento de la NVC secundaria a DMAE se administran todos por vía intravítrea, de manera que el desarrollo de una nueva terapia administrada de forma tópica no invasiva disminuiría los riesgos asociados a las inyecciones intravítreas repetidas.

En un estudio reciente se demuestra que el tratamiento con el extremo terminal 34-mer del PEDF aumenta la neuroprotección de las células ganglionares de la retina y promueve la regeneración axonal, y que este efecto es más marcado cuando el tratamiento es mediante aplicación de colirio diario en comparación con tratamiento intravítreo semanal.<sup>252</sup>

Específicamente para este estudio fueron diseñadas siete faPEDF de las cuales desconocíamos totalmente su secuencia de aminoácidos, su concentración y su peso molecular. Este ciego en el conocimiento de los fármacos por parte de los investigadores reduce los sesgos producidos por el conocimiento de la información y le añade una mayor objetividad y fiabilidad a los resultados obtenidos a este ensayo preclínico. Además, existe la posibilidad de patentes en relación a las moléculas utilizadas en este estudio, dando más sentido si cabe a que las condiciones de realización del ensayo fueran las más estrictas desde un punto de vista científico.

Inicialmente, el estudio de eficacia de las siete faPEDF se realizó mediante cultivos celulares con células HUVEC. Pensamos que la creación de modelos de líneas celulares ha disminuido el número de animales necesarios para los estudios (con la consiguiente reducción del coste y el tiempo) y contribuye a acelerar el proceso de desarrollo de medicamentos.

Por otro lado, los modelos animales incrementan en gran medida la capacidad de los científicos de estudiar la eficacia y la seguridad de los candidatos a medicamentos nuevos. Diseñar un modelo de DMAE plausible en ratones C57BL/6N era necesario para evaluar el efecto de las faPEDF sobre la retina. A pesar de que los ratones no tienen fovea, su retina es muy similar a la retina periférica de un primate. Además, la densidad de conos que tiene la retina de un ratón por mm<sup>2</sup> es muy similar a la que tiene un primate a 3 mm de la fovea.

# 5.2

## Discusión Modelo animal de DMAE exudativa

---

**E**l desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades complejas como la DMAE sigue siendo una labor difícil por la complejidad de reproducir exactamente todas las fases de la enfermedad en el tejido retiniano del animal. Sin embargo, los modelos animales de DMAE de los que disponemos actualmente han aportado mucha información acerca de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. Los modelos en roedor ofrecen la ventaja de tener un buen perfil coste-beneficio y un relativo corto período de tiempo para reproducir la enfermedad.<sup>128</sup> Además, también presentan muchas facilidades para ser manipulados genéticamente.

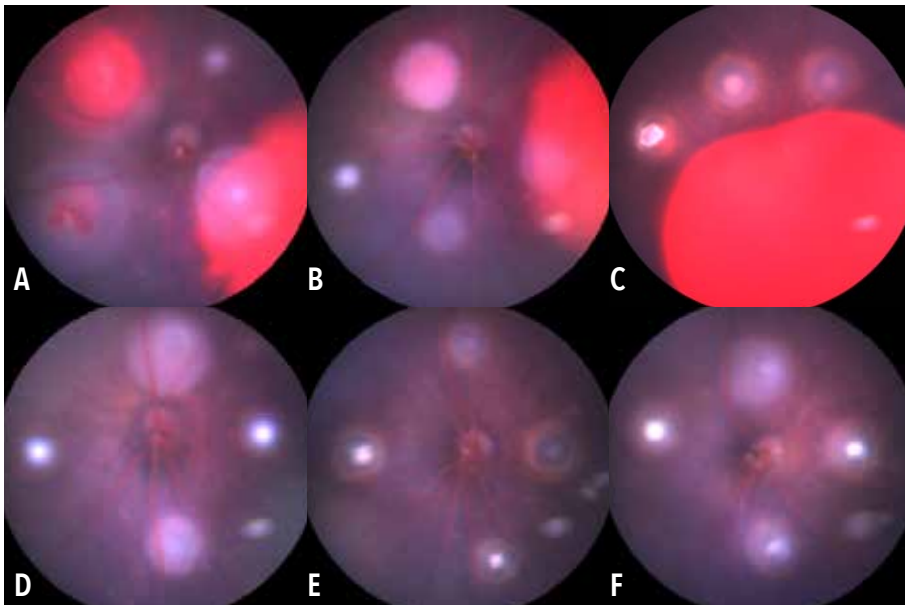
Gracias al modelo en ratón se ha sido capaz de reproducir cambios en la retina tales como el engrosamiento de la membrana de Bruch, el desarrollo de depósitos subretinianos *drusen-like* y provocar una disregulación inmune que active la vía del complemento y provoque el acúmulo de macrófagos y microglía.<sup>129</sup> Adicionalmente, el modelo de NVC en ratones inducido mediante láser ha servido de piedra angular para investigar nuevos tratamientos para la DMAE exudativa.<sup>130</sup> Sin embargo, este modelo se ve limitado por la ausencia de mácula anatómica, lo que explica porqué estos modelos no son capaces de recrear la complejidad de la evolución de una forma seca a una húmeda. Idealmente, un modelo animal de DMAE exudativa pensamos que debería incluir el componente neovascular de la enfermedad pero también los cambios seniles que aparecen en la mácula y que predisponen al crecimiento de los neovasos procedentes de la coroides.

En nuestro estudio, decidimos utilizar ratones C57BL/6N y recrear la NVC mediante láser ya que nos permitía generar varias lesiones en un mismo ojo e incrementar así la muestra poblacional para el posterior análisis estadístico en un corto período de tiempo y con un alto rendimiento coste-beneficio. Otros modelos que

utilizan inyecciones subretinianas de sustancias reproducen muy bien la NVC experimental pero técnicamente requieren una curva de aprendizaje superior, tienen un menor rendimiento coste-beneficio y sólo reproducen una lesión por animal, lo cual incrementa mucho la muestra poblacional necesaria para el análisis estadístico.<sup>128</sup>

Las condiciones del láser que mejor reprodujeron la NVC en el ratón fueron a 250 mW de intensidad y 100 ms de duración, con un tamaño de *spot* de 50  $\mu\text{m}$ . El objetivo era generar una rotura de la membrana de Bruch para provocar la aparición de NVC. Se realizaron cuatro lesiones de distribución peripapilar en cada animal.

Las quemaduras excesivamente potentes resultaron en hemorragias coroideas extensas con la consecuente cicatrización avascular y no consiguieron desarrollar NVC (figura 43), motivo por el cual no se tuvieron en cuenta a la hora de analizar los datos. Las quemaduras que provocaban un *spot* blanco en las que observamos la formación de burbujas en el centro con o sin hemorragia asociada son las que mostraron más roturas de la membrana de Bruch y consiguieron la formación de NVC.



**Figura 43.** A,B y C muestran hemorragias coroideas por exceso de potencia de láser al realizar la quemadura. Estas lesiones provocan cicatrización avascular y no desarrollan NVC. D,E y F muestran *spots* blancos en los que se observó la formación de una burbuja en el centro de la lesión al momento de realizar el impacto. Estas lesiones rompen la membrana de Bruch y dan lugar a la posterior formación de NVC.



# 5.3

## Discusión Forma de administración farmacológica

---

Los tratamientos para las enfermedades retinianas crónicas históricamente han estado limitados por varios factores. Muchos fármacos no pueden pasar a través de la córnea/esclera cuando son administrados tópicamente. Además, el ojo está protegido del torrente sanguíneo por la barrera hemato-retiniana por lo que la biodisponibilidad ocular después de una administración sistémica normalmente es muy baja. La alternativa a la administración tópica o sistémica es la inyección intravítrea. El fármaco se introduce directamente dentro de la cavidad vítrea mediante inyección a través de la esclera. Este procedimiento garantiza la llegada del fármaco a la retina en su máxima concentración, pero puede conllevar ciertos efectos adversos como endoftalmitis, catarata, desprendimiento de retina o hipertensión ocular. Los compuestos que se están usando actualmente tienen un tiempo de vida limitado dentro del ojo, obligando a administrarlos repetidamente, hecho que empeora los posibles efectos adversos debidos a la inyección intravítrea.

La terapia más efectiva hasta la fecha para el tratamiento de la NVC secundaria a la DMAE es la administración intravítrea mensual de anti-VEGF, pero esta terapia conlleva los riesgos de las repetidas inyecciones intraoculares y solamente actúa sobre la NVC.

En los últimos años se ha producido un aumento exponencial del uso de inyecciones intravítreas por la expansión de sus aplicaciones clínicas, principalmente edema macular, enfermedades inflamatorias y neovascularización subretiniana. Aunque algunos de los fármacos utilizados no estén diseñados para su uso intraocular, esta vía de administración es unánimemente aceptada, siendo en la actualidad su uso generalizado, reconociéndose sus ventajas frente a otras vías de administración en el tratamiento de ciertas enfermedades oculares.<sup>253</sup> Este tipo de tratamiento se está aplicando a un gran número de pacientes, y así se prevé que se siga haciendo

hasta que se encuentren otras vías tanto o más eficaces para la introducción de fármacos dentro del globo ocular. Además, se están efectuando las inyecciones de forma repetida, puesto que las enfermedades que se tratan suelen ser de curso crónico con necesidad de mantener el efecto terapéutico durante largos períodos de tiempo. Debemos tener en cuenta que el resultado de los tratamientos intravítreos dependen de la eficacia de la medicación inyectada y de los riesgos que conlleva el mismo procedimiento de inyección.

La vía de administración tópica de fármacos está actualmente en una situación emergente como alternativa en el tratamiento de las enfermedades vitreoretinianas (figura 44). La administración tópica no invasiva en forma de colirio permite disminuir mucho los riesgos asociados que presentan las inyecciones intravítreas repetidas y aumenta la adherencia del paciente al tratamiento. Riesgos como la endoftalmitis, la hemorragia vítrea y el desprendimiento de retina, a pesar de ser poco frecuentes, se reducen drásticamente cuando se cambia la forma de administración de inyección intravítrea a una forma en colirio.

La administración de fármacos en forma de colirio para las enfermedades retinianas tiene ciertas ventajas; permite que el propio paciente se aplique el tratamiento, provoca un efecto terapéutico localizado, es un modo de administración no invasivo y indoloro y el paciente cumplirá mucho más la pauta terapéutica establecida.

Además de presentar una distancia de difusión más elevada, la trayectoria de un fármaco administrado por vía tópica que tiene que realizar su función terapéutica en el polo posterior del ojo es obstaculizado por muchos componentes, por ejemplo el epitelio y endotelio corneal, la conjuntiva, la esclera y la naturaleza acelular de humor vítreo.

Precisamente debido a estas barreras, el desarrollo de fórmulas tópicas para el tratamiento de enfermedades retinianas se ha convertido en impredecible. Menos de 1/100.000 de la cantidad de fármaco administrada tópicamente alcanzará la retina, y a menudo esta cantidad estará por debajo de la concentración terapéutica del fármaco.

Todos los péptidos sintéticos derivados de la proteína PEDF que se sintetizaron específicamente para este estudio fueron péptidos de peso molecular inferior a 2 kDa, permitiendo de este modo que fuera más fácil su absorción y poder penetrar mejor las barreras biológicas explicadas anteriormente.

Estudios de Ahmed y Paton<sup>239</sup> demostraron la absorción de fármacos en los tejidos del polo posterior del ojo. También evaluaron la distribución y disposición del timolol aplicado tópicamente a través de la absorción por la vía corneal y no corneal. Identificaron que la absorción conjuntival fue la responsable del 40% de

Medicamento/formulación	Modelo animal	Resultado
Brimonidina colirio	Monos y conejos	Concentración de brimonidina en humor vítreo de mono fue de $82 \pm 45$ nM. En conejos los resultados fueron similares, confirmando la capacidad de la brimonidina de alcanzar el polo posterior tras su aplicación tópica.
Betoptic® (0.5% betaxolol)	Conejo	Se halló betaxolol en la retina y éste podría contrarrestar los efectos negativos de la isquemia/reperfusión.
Flunarizina	Conejo y retina de rata	La flunarizina se detectó en la retina tras su administración tópica.
Dexametasona colirio	Conejo	Aproximadamente el 60% de la concentración retiniana de dexametasona se debe a su administración tópica, el resto proviene de la administración sistémica.
Dexametasona/ciclodextrina	Humanos	El complejo dexametasona/ciclodextrina fue bien tolerado y mejoró la agudeza visual, reduciendo el grosor macular central.
Trusopt® (dorzolamida 2%) Azopt® (brinzolamida 1%)	Conejo	Se obtuvo una mayor concentración de dorzolamida en los humores acuoso y vítreo y en nervio óptico, en comparación con brinzolamida.
Hesperidina y hesperetina	Conejo	El cloruro de benzalconio mejoró los niveles de hesperetina en el segmento posterior.
Aesculina gel	Conejo	La concentración de aesculina fue significativamente mayor en presencia de goma gelano desacetilada.
Voclosporina nanomicelar	Conejo	Se detectó una alta concentración de voclosporina en retina y coroides.
Dexametasona nanomicelar	Conejo	Se detectó dexametasona en retina/coroides (~50 ng/g de tejido).
scFv, fragmento de anticuerpo (~28 kDa)	Conejo	El scFv fue detectable en el vítreo tras 4-12 h, y el uso de caprato de sodio incrementa su permeabilidad.

**Figura 44.** Fármacos que alcanzan el polo posterior tras su aplicación en colirio. Adaptado de Boddu S. *et al.* Recent Patents on Drug Delivery & Formulation 2014, 8, 27

la cantidad total de timolol intraocular. Acheampong *et al.*<sup>199</sup> estudiaron la distribución de brimonidina en el segmento anterior y posterior del ojo tras su aplicación tópica en modelos de neuroprotección de monos y conejos, observando una elevada concentración de fármaco en la cavidad vítrea de esos animales. Palanki *et al.*<sup>248</sup> desarrollaron inhibidores de la benzotriazina que se unían al VEGFR2 en modelo animal de conejo con NVC inducida mediante láser. El tratamiento se aplicó de forma tópica, observando concentraciones significativas de fármaco en retina y coroides sugiriendo un efecto terapéutico del fármaco aplicado tópicamente en enfermedades del segmento posterior.

Las propiedades físico-químicas de los fármacos, tales como la lipofilia, solubilidad en agua y peso molecular juegan un papel importante a la hora de determinar la habilidad del mismo para cruzar las barreras biológicas del ojo y alcanzar la retina. Por ejemplo la dorzolamida (324 Da) y la brinzolamida (383 Da) son inhibidores de la anhidrasa carbónica utilizadas en el tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto. Ambas tienen pesos moleculares similares, sin embargo las características de lipofilia y solubilidad son muy diferentes. La aplicación tópica de dorzolamida obtuvo un incremento significativo en el flujo sanguíneo de

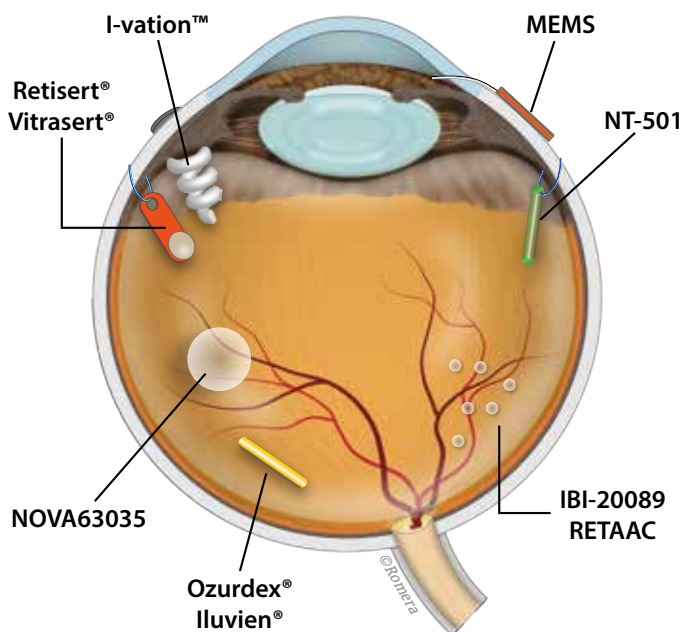
la retina y del disco óptico comparado con la brinzolamida.<sup>254</sup> Esta variación en el efecto farmacológico es principalmente debida a la habilidad de la dorzolamida de penetrar mejor las barreras oculares y alcanzar el segmento posterior del ojo con mayores concentraciones de fármaco.

Actualmente existen otros sistemas diseñados para administrar fármacos en el polo posterior del ojo de una manera más prolongada que están siendo utilizados o bien se encuentran en diferentes fases de desarrollo e investigación (figura 45).

La difusión transescleral es una técnica interesante para administrar fármacos en el segmento posterior porque aplica la molécula directamente adyacente en la coroides y en el EPR. A pesar de que la inyección periocular es habitualmente más segura que la inyección intravítrea, existen barreras de absorción a través de esta ruta, puesto que el fármaco tiene que atravesar la epiesclera, la esclera, la coroides, la membrana de Bruch y el EPR. Muestra de ello es que la concentración más elevada de fármaco mediante esta técnica se encuentra en la esclera y las menores en retina y vítreo. Además, los mecanismos de aclaramiento subconjuntival pueden afectar la duración de tiempo de actuación del fármaco. A pesar de todo, con el desarrollo de nuevas modificaciones en los dispositivos de liberación de fármacos, esta ruta puede realmente ser una alternativa viable a la inyección intravítrea.

Pontes de Carvalho *et al.*<sup>255</sup> han descrito un reservorio epiescleral de fármaco. Mediante un explante de silicona impermeable, se fija a la esclera y los fármacos dispuestos en su interior tienen una exposición limitada en el tiempo de ser aclarados por los vasos conjuntivales. Este dispositivo incrementa la cantidad de fármaco que se administra a la retina y el vítreo comparado con las inyecciones periorbitales. En modelos animales, este reservorio epiescleral aumentó la biodisponibilidad intravítrea entre 30-40 veces más en comparación con la inyección estándar subtenon. El tiempo de duración de la acción farmacológica también se incrementó 21 veces más comparativamente. Además, la administración transescleral de biopéptidos de tamaño similar al bevacizumab (149 kDa) ha sido posible mediante este sistema.<sup>256</sup> Otro mecanismo de liberación transescleral es un dispositivo de silicona que actúa a modo de cavidad y se coloca anatómicamente en el área macular. En estudios con conejos, se llenó la cavidad con betametasona y los niveles de fármaco se mantuvieron durante cuatro semanas en la coroides del área macular.<sup>257</sup> También se ha investigado colocar en el espacio subconjuntival bevacizumab formulado en modo de tableta sólida depot, viéndose incrementada la duración de la acción de inhibición del VEGF de 2 horas a 6 días.<sup>258</sup>

Se han desarrollado implantes intraoculares de liberación sostenida y algunos incluso ya están disponibles comercialmente desde hace tiempo. Las ventajas que proporcionan al ser administrados directamente en la cavidad vítrea son evidentes: se eliminan las barreras de biodisponibilidad y las dosis efectivas son previsibles,



**Figura 45.** Ejemplos de dispositivos de liberación sostenida intravítrea de fármacos. Adaptado de Kuno N, Fujii S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders. *Drugs Aging* 2010,27,117-34.

evidentes y con mínimos picos de variación. Sin embargo, la implantación quirúrgica es invasiva y no está libre del riesgo de crear yatrogenia. El objetivo de estos implantes es incrementar el tiempo de duración del efecto terapéutico del fármaco en cuestión, disminuir los efectos de dosis en forma de pulsos y mejorar la flexibilidad de las pautas de tratamiento. Se han diseñado tanto sistemas biodegradables como no biodegradables. Algunos requieren de implantación en quirófano mientras otros se pueden insertar cómodamente en la consulta. De los dispositivos biodegradables, el primer implante intraocular de liberación sostenida diseñado fue el Vitrasert® (Bausch + Lomb), un dispositivo que se fija a la esclera y dispensa ganciclovir durante 6 meses en pacientes con retinitis por citomegalovirus. El Retisert® es otro dispositivo de acetónido de fluocinolona (Bausch + Lomb) fijado a esclera que libera medicación durante 3 años en pacientes con uveítis. Sin embargo, se observó una elevada tasa de catarata y un 40% de los pacientes requirieron cirugía de glaucoma.<sup>259</sup>

Otro dispositivo que es implantado quirúrgicamente y que utiliza la tecnología de células encapsuladas, está siendo actualmente desarrollado por Neurotech. El implante se introduce a la cavidad vítrea a través de una incisión escleral y se fija con una sutura. Este dispositivo contiene células de EPR humano genéticamente modificadas para secretar una sustancia. La presencia de una membrana semiper-

meable permite al difusión hacia fuera del fármaco y otros metabolitos celulares y la difusión hacia dentro de nutrientes que permiten la supervivencia celular y a la vez protege el contenido de ser atacado inmunológicamente. Una versión de este dispositivo (NT-501) ha sido diseñada para secretar factor ciliar neurotrófico y ya ha sido evaluada en un ensayo fase II para el tratamiento de la atrofia geográfica secundaria a DMAE.<sup>260</sup> Otra versión (NT-503) secreta una proteína de fusión Fc que actúa de VEGFR y que ha demostrado ser 20 veces más eficiente neutralizando el VEGF que el ranibizumab en un modelo animal de conejo.

El Iluvien® (acetónido de fluocinolona, Alimera Sciences) es otro dispositivo no biodegradable que no se fija a esclera y por lo tanto no requiere ser implantado quirúrgicamente. El dispositivo es suficientemente pequeño para poder ser inyectado en la consulta mediante una aguja de 25G y que proporciona liberación sostenida de fluocinolona en la cavidad vítrea durante 3 años. En el ensayo fase III aleatorizado con 36 meses de seguimiento, la incidencia de cirugía de catarata en paciente fágicos de inicio fue del 80%, mientras que el 4,8% de los pacientes requirieron cirugía para reducir la presión intraocular.<sup>261</sup>

El I-vation® es un implante helicoidal de titanio recubierto de componentes poliméricos que liberan gradualmente el fármaco. El concepto proviene originalmente de los stents coronarios utilizados en arterias estenosadas de pacientes con cardiopatía isquémica. En un estudio fase I de pacientes con edema macular diabético se observó la liberación de triamcinolona mediante este dispositivo durante 18-38 meses.<sup>262</sup>

El Ozurdex® (dexametasona, Allergan) es un implante intravítreo de liberación sostenida biodegradable con una duración del efecto de entre 3 y 6 meses, inyectado mediante una aguja de 22G. Actualmente está aprobado su uso en pacientes con uveítis, edema macular diabético y edema macular secundario a oclusión venosa de la retina. Diferentes estudios difieren acerca de la incidencia de la necesidad de cirugía de catarata (5%) y cirugía de glaucoma (1%) a los 6 meses en pacientes tratados con Ozurdex.<sup>263</sup>

Los sistemas micro-electromecánicos (MEMS) también han sido estudiados para administrar fármacos intraoculares. Los dispositivos MEMS contienen un reservorio de medicación con un acceso para ser rellenados, una batería y un software electrónico que se implanta en el espacio subconjuntival con una cánula flexible que se inserta a través de una incisión escleral a la cavidad vítrea donde libera el fármaco. Este sistema utiliza el concepto de la electrolisis para transmitir el volumen y la dosis deseados. Puede ser recargado con fármaco permitiendo obtener terapias mucho más largas sin la necesidad de cirugías repetidas.<sup>264,265</sup>

La iontoforesis es una novedosa técnica no invasiva que utiliza una corriente eléctrica para conducir fármacos en forma de iones a través de un tejido o membrana. Una señal de corriente eléctrica débil dirige las moléculas cargadas a través de la esclera hacia la coroides, retina y vítreo. En realidad, el fármaco en si mismo se utiliza de propio conductor. Este nuevo mecanismo de iontoforesis no ha reportado hasta el momento alteración de la estructura funcional del ojo. Se puede utilizar para en forma de depot en la esclera para una liberación sostenida y así reducir el número y la frecuencia de tratamientos necesarios.<sup>266</sup>

También se han utilizado microagujas del tamaño de entre 800  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$  para inyectar nanopartículas en el espacio supracoroideo en ojos de conejo, cerdo y de cadáver humano. La inyección mediante microagujas permite alcanzar el tejido coroideo mucho mejor que la inyección intravítrea, permitiendo administrar el fármaco de una forma segura y disminuyendo la exposición local y sistémica del mismo.<sup>267</sup> El espacio supracoroideo también se ha investigado como espacio anatómico para el implante de sistemas de liberación sostenida.<sup>268</sup> Existe un dispositivo disponible comercialmente para administrar fármacos al espacio supracoroideo denominado *iTrack microcatheter* (iScience Interventional). Contiene una microcánula que incorpora una fibra óptica que permite la transmisión de luz desde el extremo para guiar la inserción quirúrgica. Tetz *et al.* han publicado la administración de 4 mg de bevacizumab y 4 mg de triamcinolona al espacio supracoroideo a nivel submacular mediante este dispositivo en 21 pacientes con DMAE exudativa sin complicaciones intra ni postoperatorias severas.<sup>269,270</sup>

El dispositivo ideal para administrar fármacos al segmento posterior de una manera prolongada y constante debería combinar las siguientes consideraciones: tener una localización anatómica apropiada, por ejemplo en la cavidad vítrea, el espacio subretiniano o el espacio supracoroideo; la capacidad de poder liberar múltiples fármacos para terapias combinadas; una liberación controlada que permita que el fármaco alcance el objetivo terapéutico en el tiempo deseado y la suficiente concentración que le permita mantener durante el máximo tiempo posible un efecto terapéutico y los mínimos efectos adversos. A pesar de ser tecnológicamente difícil de desarrollar, un reservorio rellenable sería el diseño ideal.

La investigación del uso de proteínas o cadenas de aminoácidos con fines terapéuticos para tratar enfermedades de la retina está actualmente en aumento. A pesar de que ya se han desarrollado dispositivos de liberación sostenida de corticoides, la administración de proteínas en el marco de sistemas de liberación sostenida presenta algunos problemas acerca de la estabilidad de las cadenas de aminoácidos en el dispositivo a la temperatura corporal humana, principalmente debido a que temperaturas elevadas aceleran la degradación de proteínas. Sin embargo, el prin-

cial problema en relación a los dispositivos de liberación sostenida de proteínas reside en el fenómeno de la hidrólisis. Las proteínas requieren una formulación en seco para mantener su estabilidad, así que un sistema de liberación sostenida de proteínas debería incorporar una barrera para evitar la hidrólisis. En contraposición, los sistemas de polímeros biodegradables y las bombas necesitan el proceso de hidrólisis para su correcto funcionamiento, hecho que hace más dificultoso el concepto de combinar la administración de proteínas mediante estos sistemas.

La terapia génica, al provocar que las propias células del individuo sean las que produzcan las proteínas terapéuticas de manera continua, se ha convertido en una potente área de desarrollo. A través de vectores adenovirales, se introducen unos genes determinados en las células para que expresen las moléculas terapéuticas deseadas. Actualmente hay un ensayo clínico en fase I en pacientes con DMAE a los que se les inyecta el compuesto biológico (rAAV.sFlt-1) subretiniano y se compara con pacientes tratados con ranibizumab.



# 5.4

## Discusión Resultados de experimentos *in vitro*

---

Cuando los estudios *in vitro* compararon las siete faPEDF con efectos antiangiogénicos a diferentes concentraciones en cultivos celulares con células endoteliales y VEGF, se observó de una manera muy clara que disminuían el efecto angiogénico producido por el VEGF, demostrando el potente efecto antiangiogénico que ejerce el PEDF.

La migración de células endoteliales tiene un papel muy importante en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos,<sup>271</sup> tales como el desarrollo embrionario, la remodelación y regeneración tisular, cicatrización de tejidos, angiogénesis y muchos otros más. La mínima concentración necesaria para inhibir la migración de células endoteliales para la formación de neovasos fue de 10 nM y la observamos en las faPEDF2 y faPEDF3.

Las células endoteliales forman estructuras tubulares imitando los pasos que se producen durante la formación de vasos en la angiogénesis. La faPEDF2 se mostró efectiva en disminuir la formación tubular desde concentraciones muy bajas (5 nM). Sin embargo, la faPEDF3 empezó a ser efectiva inhibiendo la formación de túbulos a partir de concentraciones 10 nM. Claramente estas 2 fracciones activas de PEDF se mostraron superiores a las demás a la hora de inhibir procesos que imitan la angiogénesis, sugiriendo un mayor efecto en patologías en las que la formación de neovasos sea el principal mecanismo a inhibir.

Inicialmente, el factor VEGF fue identificado como factor de crecimiento de células endoteliales estimulando la angiogénesis y la permeabilidad vascular. También presenta funciones autocrinas que le permiten actuar como factor de supervivencia de células protegiéndolas del estrés causado por la hipoxia. Las diferentes faPEDF actuaron bloqueando la supervivencia celular generada por el VEGF. Observamos

que dicha inhibición fue dosis dependiente, y que a partir de concentraciones 5 nM las faPEDF2 y faPEDF3 abolieron completamente los efectos de supervivencia celular mediada por VEGF.

La efectividad antiangiogénica evaluada en los ensayos *in vitro* puso de manifiesto que las faPEDF2 y faPEDF3 fueron las que más eficacia demostraron y por lo tanto las que potencialmente funcionarían más en un modelo *in vivo* de DMAE exudativa para poder ser posteriormente desarrolladas como posibles agentes terapéuticos. Al valorar conjuntamente con la empresa desarrolladora de las moléculas su inclusión y adaptación a la fase *in vivo* del ensayo se decidió que la faPEDF3 presentaba unas características que la convertían farmacológicamente más desarrollable a nivel industrial que la faPEDF2. Así pues, los tres principios activos de los colirios desarrollados para la fase *in vivo* fueron la faPEDF3 1 mg/ml (colirio A), faPEDF3 10 mg/ml (colirio B) y placebo (colirio C).

# 5.5

## Discusión Resultados de experimentos *in vivo*

---

**E**n la primera fase del desarrollo del modelo animal de NVC observamos que el mayor incremento de tamaño de lesión se produjo entre los 4 y 7 días posteriores a la realización de la lesión mediante láser verde con unos parámetros establecidos en 250 mW de potencia, 100 ms de duración y 50  $\mu\text{m}$  de *spot*. En los estudios con angiografía fluoresceínica observamos inicialmente (2-4 días) una disminución en el tamaño de las lesiones inducido por una disminución en la respuesta inflamatoria, incrementando su tamaño posteriormente con la aparición de neovasos. Con los resultados obtenidos, la hipótesis que se planteó es que el lapso de tiempo en el que podríamos observar un beneficio del tratamiento mediante faPEDF sería entre los días 4 y 7.

Los estudios mediante fERG mostraron una reducción en la amplitud de las ondas a y b y un aumento del tiempo implícito, indicativo de un mal funcionamiento de la retina en las zonas que se habían lesionado con el láser verde. Sin embargo, estos resultados fueron debidos en su gran mayoría a la lesión provocada por el láser y no a las consecuencias derivadas de esta (inflamación, neovascularización), por ese motivo pensamos que el fERG no era una buena prueba para monitorizar el efecto del tratamiento con las diferentes faPEDF en la NVC. Además, existen diferencias anatómicas entre los modelos murino y los humanos en lo que se refiere al efecto de coagulación que se produce en la retina neurosensorial adyacente al realizar el impacto mediante láser en los ratones, cosa que no ocurre en la DMAE exudativa en humanos. Actualmente se desconoce qué extensión de tejido retiniano circundante se puede alterar al realizar la NVC experimental, la cual cosa dificultaría aun más la valoración de un posible efecto terapéutico mediante esta técnica.

La aparición de las primeras células endoteliales se observó a partir de los días 3-5 posteriores a la inducción de la lesión con láser y fue a partir del día 7 cuando se empezó a observar la formación de neovasos. El marcador de estrés glial GFAP evaluado a través de la extracción de RNA de la retina y el análisis de su expresión génica mostró su máxima expresión el día 3 post-láser. Las propiedades estructurales del citoesqueleto de las células astrocíticas son mantenidas gracias a la red de filamentos intermedios de la cual el componente fundamental es la proteína GFAP. Además de las propiedades estructurales, se ha propuesto que la red de filamentos intermedios tiene otras asociadas a transducción de señales biomecánicas y moleculares. La sobreexpresión de la proteína GFAP fue provocada como respuesta al daño provocado en el tejido neuroretiniano a través de la lesión producida mediante el láser.

La proteína relacionada con los procesos inflamatorios MCP-1 es atrayente de monocitos y es expresada por las células endoteliales y las células del EPR. Únicamente se encontró elevada su expresión el primer día post-láser, indicando que es consecuencia de un proceso inflamatorio agudo durante las primeras horas y que rápidamente vuelve a su condición normal.

La sobreexpresión de VEGF mostró su nivel máximo el día 3, alcanzando significación estadística. El VEGF es un factor proangiogénico y se encuentra sobreexpresado en procesos de neovascularización, como es en el caso de la NVC.

A través de los resultados obtenidos en la aparición de neovasos mediante los estudios con inmunofluorescencia en *flatmount* y sabiendo que el tamaño de la NVC se estabiliza e incluso empieza a disminuir a partir del día 14 post-inducción con láser por el propio proceso de cicatrización (a pesar de que la NVC sigue activa), decidimos crear 2 ventanas de evaluación del efecto terapéutico de las diferentes faPEDF a los 7 y 14 días.

Se han encontrado niveles aumentados de PEDF en vítreo durante los siete primeros días tras inducción de NVC mediante láser en estudios con ojos de rata.<sup>272</sup> Sin embargo, los niveles de PEDF volvieron a su nivel basal a partir de ese momento. Este incremento transitorio de los niveles de PEDF puede ser a consecuencia de la liberación por parte de las células dañadas, concretamente de las células del EPR localizadas en la matriz de los interfotorreceptores, el complejo funcional donde las células del EPR interactúan con los fotorreceptores. También podría deberse a un intento que realiza el propio cuerpo para compensar endógenamente el incremento de los niveles de VEGF.

El tratamiento mediante el péptido PEDF entero y del extremo 34-mer subconjuntival ha demostrado la capacidad de inhibir la formación de vasos sanguíneos y atenuar la NVC en modelo animal de rata inducida mediante láser.<sup>127</sup> Al

cortar el extremo carboxilo (COOH-terminal) del péptido se mantuvo la misma actividad antiangiogénica que con el péptido entero, así pues, al utilizar una molécula más corta y con menos peso molecular como el péptido 34-mer se favorece la absorción de la molécula y su biodisponibilidad en el polo posterior.

Pensamos que al utilizar una fracción de la molécula 34-mer que sea funcionalmente activa y por lo tanto disminuyendo aun más el tamaño de la molécula efectiva se verá incrementada su penetración hacia el tejido retiniano potenciando así su efecto terapéutico.

El tratamiento tópico de las faPEDF3 1 mg/ml, faPEDF3 10 mg/ml y placebo se inició dos días antes de la inducción de la NVC con el fin de alcanzar unos niveles elevados de PEDF desde el primer momento y poder observar su efecto terapéutico en la retina. Se decidió realizar una pauta de instilación única cada 24 horas, ya que el objetivo del estudio era determinar si la faPEDF ejerce algún efecto sobre la NVC y no el determinar la posología necesaria. No se observaron efectos secundarios groseros a nivel ocular en los ratones con ninguna de las dosis, pero esto debe ser estudiado más en profundidad porque tampoco se diseñó como un estudio de toxicidad.

Hasta la conclusión del ensayo y el posterior análisis de datos los investigadores no conocieron a qué concentración se encontraba la faPEDF3 en cada grupo ni cuál era el grupo placebo. Esta metodología fue utilizada para prevenir que los resultados de la investigación pudieran estar influidos por el sesgo del observador.

En el análisis a los 7 días mediante angiografía fluoresceínica no se observaron diferencias entre los 3 grupos de tratamiento. Esto puede ser debido a que durante los primeros días tras la formación de la NVC el tamaño de las lesiones tiende a disminuir y es a partir del día 7 cuando la tendencia es a incrementar su tamaño por la formación de neovasos. Sin embargo, a los 14 días post-láser los ojos tratados con los colirios A y B (faPEDF3 1 mg/ml y faPEDF3 10 mg/ml respectivamente) presentaron una reducción estadísticamente significativa de las áreas de neovascularización subretiniana en comparación con el placebo.

En el estudio de inmunofluorescencia en *flatmount* para la detección de células endoteliales se observó que el área de neovasos formados en los ojos tratados con el colirio A (faPEDF3 1 mg/ml) fue significativamente más pequeña tanto a los 7 días como a los 14 días post-láser cuando la comparamos con el área de neovasos formados en los ojos tratados con el colirio C (placebo). Además, también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el área de formación de neovasos de los animales tratados con el colirio A en comparación con el colirio B (faPEDF3 10 mg/ml) a los 7 días post-láser, siendo siempre menor la proliferación de neovasos en los animales tratados con el colirio A. Sin embargo, estas

diferencias entre los dos tratamientos no alcanzaron la significación estadística a los 14 días, a pesar de ser claramente más inhibitorio para la formación de neovasos el tratamiento A que el B.

Estas diferencias entre los tratamientos A y B se podrían explicar por la diferente osmolalidad y pH entre los colirios que hacen que el tratamiento B con faPEDF3 10 mg/ml sea más inestable en su forma de colirio y por lo tanto menos eficaz. Una vez roto el ciego, el laboratorio nos informó que el vehículo utilizado en ambos colirios era un tampón y se había comprobado que la fuerza iónica (concentración de sales en el tampón) mantuviera el pH tanto para la concentración de péptidos 1 mg/mL como para la concentración 10 mg/ml.

Los datos de osmolalidad son determinaciones que se estudian una vez obtenida la prueba de eficacia, para caracterizar la formulación final a desarrollar. Los péptidos aportan osmolalidad y a más concentración mayor es este aporte. El colirio de concentración 10 mg/mL podría estar fuera del rango de osmolalidad permitido para un colirio: 270-330 mOsm/Kg, impidiendo que esta dilución fuera capaz de atravesar las membranas tan bien como la concentración 1 mg/ml.

Respecto a la justificación de dosis, la concentración 1 mg/mL es económicamente viable a nivel comercial, y se basa en el rango de concentración del principio activo en la mayoría de colirios aprobados y en uso clínico (0.1%). Por ejemplo, el colirio de somatostatina que está actualmente en evaluación en fase II/III también tiene una concentración 0,1% (1 mg/mL).<sup>245</sup>

La idea de utilizar una concentración 10 veces superior era explorar un rango superior muy por encima de 1 mg/mL por si no se hubiese obtenido actividad a 1 mg/mL. Si 1 mg/mL no hubiera sido activo y 10 mg/mL sí hubiese sido activo, se podría haber realizado un segundo ensayo para encontrar la mínima dosis eficaz (e.g. con 5 mg/mL, 2 mg/mL). También queda abierto el determinar cuál es la posología ideal que muestra más efecto terapéutico, puesto que en el diseño de este estudio sólo se aplicó el tratamiento una vez al día, quedando para evaluar el efecto que tendrían dosis repetidas de fármaco.

En el análisis de los niveles de expresión génica de GFAP y MCP-1 no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos A, B y C. La expresión de GFAP si se encontró más disminuida en los tratamientos con colirio faPEDF3 A (1 mg/ml) y B (10 mg/ml), pero sin alcanzar significación estadística. Sin embargo, dicha disminución no se observó al analizar la expresión génica de MCP-1 relacionada con procesos inflamatorios. Esto puede ser debido a que la mayor expresión de MCP-1 tras la formación de la NVC ocurre en las primeras 24 horas, evaluando en este caso sus niveles a los 3 días.

Sin embargo, a diferencia de estos dos genes, sí que se observó una disminución significativa de la expresión de VEGF en los ojos de ratones C57BL/6N tratados con colirio A (faPEDF3 1 mg/ml) y colirio B (faPEDF3 10 mg/ml) y no en aquellos tratados con colirio C (placebo), lo cual sugiere una disminución del efecto de neovascularización en esos dos grupos de tratamiento. Sabemos que una de las vías propuestas de inhibición de la angiogénesis por el PEDF es a través de su adhesión con integrinas favoreciendo su unión al receptor del VEGF121. Por otro lado, se ha postulado también que el epítipo funcional del PEDF 44-mer se une a un receptor induciendo el efecto neurotrófico, mientras que el péptido 34-mer se uniría a otro tipo de receptor induciendo la apoptosis, bloqueando la migración de células endoteliales y por lo tanto inhibiendo la angiogénesis.<sup>93</sup>

Se ha descrito la disminución de los niveles de PEDF en el lugar de la NVC inducida mediante el láser así como también en la coroides de humanos con DMAE.<sup>273</sup> Así pues, la administración local de la faPEDF3 podría incluso ser útil no solamente como tratamiento de la NVC sino también para restablecer el balance antiangiogénico y evitar así que aparezca la NVC. Diferentes estudios han demostrado el efecto de incrementar los niveles endógenos de PEDF mediante terapia génica provocando una disminución en la aparición de NVC.<sup>274-277</sup> Así pues, del mismo modo en que la disminución de los niveles de PEDF juega un papel muy importante en el desarrollo de NVC, los resultados obtenidos de este estudio sugieren que utilizar una fracción activa de PEDF puede ser útil en el tratamiento de la DMAE exudativa.





# 5.6

## Conclusiones

---

### 1. Fase *in vitro*:

Las faPEDF2 y faPEDF3 se mostraron eficaces inhibiendo los efectos del VEGF, la formación tubular, la migración y proliferación celular.

### 2. Fase *in vivo*:

- 2.1. La realización de láser verde 532nm mediante el equipo Micron III con parámetros de 250 mW de potencia, 100 ms de duración y 50  $\mu$ m de tamaño de *spot* fue el modelo más adecuado y reproducible de NVC en ratón C57BL/6N.
- 2.2. La administración diaria de la faPEDF3 en forma de colirio a una concentración de 1 mg/ml en ratones C57BL/6N causó una mayor reducción de la superficie de NVC respecto al placebo cuando esta fue evaluada mediante inmunofluorescencia y angiografía fluoresceínica.
- 2.3. La faPEDF3 1 mg/ml provocó una disminución en la expresión de VEGF en los ojos tratados respecto al placebo. No se observaron modificaciones en la expresión génica de GFAP y MCP-1 de los ojos tratados con la faPEDF3 1 mg/ml en comparación con el placebo.



# Bibliografía

---

1. Macular Photocoagulation Study Group. Arch Ophthalmol. 1991; 109(9): 1217-8
2. Jager RD, Mieler WF, Miller JW (2008) Age-related macular degeneration. N Engl J Med 2008; 358: 2606 -2617.
3. Klein R, Klein BE, Lee KE, Cruickshanks KJ, Gangnon RE. Changes in visual acuity in a population over a 15-year period: the Beaver Dam Eye Study. Am J Ophthalmol. 2006; 142(4):539-49.
4. Gohdes DM, Balamurugan A, Larsen BA, Maylahn C. Age-related eye diseases: an emerging challenge for public health professionals. Prev Chronic Dis. 2005; 2(3):A17.
5. Klein R, Cruickshanks KJ, Nash SD, Krantz EM, Javier Nieto F, Huang GH *et al.* The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. Arch Ophthalmol. 2010; 128(6):750-8.
6. Muñoz B, West SK, Rubin GS, Schein OD, Quigley HA, Bressler SB, Bandeen-Roche K. Causes of blindness and visual impairment in a population of older Americans: The Salisbury Eye Evaluation Study. Arch Ophthalmol. 2000; 118(6):819-25.
7. Klaver CC, Wolfs RC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study. Arch Ophthalmol. 1998; 116(5):653-8.
8. VanNewkirk MR, Weih L, McCarty CA, Taylor HR. Cause-specific prevalence of bilateral visual impairment in Victoria, Australia: the Visual Impairment Project. Ophthalmology. 2001; 108(5):960-7.
9. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Muñoz B, Friedman DS, Kempen J, Taylor HR, Mitchell P; Eye Diseases Prevalence Research Group.

- Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122(4):477-85.
10. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA *et al.* The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol.* 1980; 24(Suppl):335-610.
  11. Marticorena J, Gómez-Ulla F, Lago JR. Epidemiología de la degeneración macular asociada a la edad. En: Monés J, Gómez-Ulla F, editores. *Degeneración macular asociada a la edad.* Barcelona: Prous Science; 2005.p 29-43.
  12. Casado J. Epidemiología de la degeneración macular asociada a la edad. *Annals d'Oftalmologia.* 2009; 17(5):264-286.
  13. Seddon JM, Willett WC, Speizer FE, Hankinson SE. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. *JAMA* 1996; 276:1141-6.
  14. Beatty S, Koh H, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000; 45:115-34.
  15. Arias Barquet L. Epidemiología, etiopatogenia y factores de riesgo de la DMAE. *La Medicina Hoy.* 2003; 154 (1.462): 30-32.
  16. West SK, Rosenthal FS, Bressler NM, Bressler SB, Munoz B, Fine SL *et al.* Exposure to sunlight and other risk factors for age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 1989; 107(6):875-9.
  17. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE. Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 1993;111(4):514-8.
  18. Darzins P, Mitchell P, Heller RF. Sun exposure and age-related macular degeneration. An Australian case-control study. *Ophthalmology.*1997; 104(5):770-6.
  19. Pollack A, Marcovich A, Bukelman A, Oliver M. Age-related macular degeneration after extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation. *Ophthalmology.* 1996; 103(10):1546-54.
  20. Klein RJ, *et al.* Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308: 385 -389.
  21. Rivera A, *et al.* Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3227 -3236.
  22. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. Perspective. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol.* 2002; 134:411-431.
  23. Cherepanoff S, McMenamin P, Gillies MC, Kettle E, Sarks SH. Bruch's membrane and choroidal macrophages in early and advanced age related macular degeneration *Br J Ophthalmol.* 2010; 94(7):918-25.

24. Nussenblatt RB, Ferris F. Perspective. AMD and the immune response: implication for therapy. *Am J Ophthalmol.* 2007; 144:618-626.
25. Araiz J. Estadios previos (MAE) y DMAE seca. En: Monés J, Gómez-Ulla F, editores. *Degeneración macular asociada a la edad.* Barcelona: Prous Science; 2005. p 99-108.
26. Bressler NM, Bressler SB, West SK, Fine SL, Taylor HR. The grading and prevalence of macular degeneration in Chesapeake Bay watermen. *Arch Ophthalmol.* 1989; 107(6):847-52.
27. Gómez-Ulla FJ, Marín F, Ramirez JM, Triviño A. *La mácula senil.* Barcelona: Edika-Med; 1993.
28. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119(10):1417-36.
29. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125(9):1225-32.
30. Casswell AG, Kohen D, Bird AC. Retinal pigment epithelial detachments in the elderly: classification and outcome. *Br J Ophthalmol.* 1985; 69(6):397-403.
31. Ruiz-Moreno JM, Arias-Barquet L, Armadá-Maresca F, Boixadera-Espax A, García-Layana A, Gómez-Ulla-de-Irazazábal F *et al.* Guías de práctica clínica de la SERV: Tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) exudativa *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2009; 84: 333-344.
32. Yannuzzi LA, Negrão S, Iida T, Carvalho C, Rodriguez-Coleman H, Slakter J *et al.* Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina.* 2001;21(5):416-34.
33. Antcliff R J., and Marshall J. The pathogenesis of edema in diabetic maculopathy. *Semin. Ophthalmol.* 1999; 14: 223 -232.
34. Ghassemifar, R., Lai, C. M., and Rakoczy, P. E. VEGF differentially regulates transcription and translation of ZO-1 $\alpha$ <sup>+</sup> and ZO-1 $\alpha$ <sup>-</sup> and mediates trans-epithelial resistance in cultured endothelial and epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 2006; 323, 117 -125.
35. Hartnett, M. E., Lappas, A., Darland, D., *et al.* Retinal pigment epithelium and endothelial cell interaction causes retinal pigment epithelial barrier dysfunction via a soluble VEGF-dependent mechanism. *Exp. Eye Res.* 2003; 77, 593 -599.
36. Kvantá A, Algvare PV, Berglin L, Seregard S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1929 -1934.
37. Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial

- growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 855 -868.
38. Bhutto IA, *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2006; 82(1): 99 -110.
  39. Holekamp NM, Bouck N, Volpert O. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2002; 134: 220 -227.
  40. Spilsbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 2000;157(1): 135 -144.
  41. Ablonczy Z, *et al.* Pigment Epithelium-derived Factor Maintains Retinal Pigment Epithelium Function by Inhibiting Vascular Endothelial Growth Factor-R2 Signaling through gamma-Secretase. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(44):30177 -30186.
  42. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol*. 2006; 37:1-12.
  43. Yamagishi S, *et al.* Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) inhibits angiotensin II-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MOLT-3 T cells through anti-oxidative properties. *Microvasc Res*. 2006; 71:222-226.
  44. Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of VEGFR1. *J Biol Chem*. 2006; 281:3604-3613.
  45. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, Kerkvliet S, de Jong PT. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol* 1997;81: 154 -162.
  46. Sheikpranbabu *et al.* Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end-product-induced angiogenesis and stimulates apoptosis in retinal endothelial cells. *Life Sci*. 2009;85(21-22):719-731.
  47. Hangai M, Murata T, Miyawaki N, Spee C, Lim JI, He S *et al.* Angiopoietin-1 upregulation by vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42(7):1617-25.
  48. Kamizuru H, Kimura H, Yasukawa T, Tabata Y, Honda Y, Ogura Y. Monoclonal antibody-mediated drug targeting to choroidal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42(11):2664-72.
  49. Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, Miyamoto H, Honda Y, Ikada Y, Ogura Y. Active drug targeting with immunoconjugates to choroidal neovascularization. *Curr Eye Res*. 2000; 21(6):952-61.

50. Moore DJ, Hussain AA, Marshall J. Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36(7):1290-7.
51. Schmack I, Kang SJ, Grossniklaus HE. Histopatología de la degeneración macular asociada a la edad En: Monés J, Gómez-Ulla F, editores. *Degeneración macular asociada a la edad.* Barcelona: Prous Science; 2005. p 79-84.
52. Curcio CA, Millican CL, Allen KA, Kalina RE. Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34(12):3278-96.
53. Curcio CA, Medeiros NE, Millican CL. Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37(7):1236-49.
54. Macular Photocoagulation Study Group. Visual outcome after laser photocoagulation for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. The influence of initial lesion size and initial visual acuity. *Arch Ophthalmol.* 1994; 112(4):480-8.
55. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. *Arch Ophthalmol.* 1999; 117(10):1329-45.
56. Schmidt-Erfurth UM, Richard G, Augustin A, Aylward WG, Bandello F, Corcóstegui B *et al.* European Society for Retina Specialists' Guidelines Committee (EURETINA). Guidance for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol Scand.* 2007; 85(5):486-94.
57. Arias L, Mones, J. Terapia Fotodinámica. En: Mones J, Gómez-Ulla F. *Degeneración Macular Asociada a la Edad.* Barcelona, Prous Science, 2005; 29-41.
58. Treatment of AMD with PDT Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in AMD with verteporfin: one year results of 2 randomized clinical trials-TAP report 1. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1329-1345.
59. Verteporfin in Photodynamic Therapy (VIP) Study Group. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: 2-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization – VIP Report 2. *Am J Ophthalmol* 2001;131:541-560.
60. Reichel E, Berrocal AM, Kroll AJ, et sl. Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients ith age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1999;106:1908-1914.
61. Arias Barquet L. Actualización de terapia anti-VEGF en enfermedades de la retina y coroides. Barcelona: Elsevier; 2010.
62. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol.* 2000; 184(3):301-10.

63. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(3):227-41.
64. Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina*. 2006; 26(8):859-70.
65. Ciulla TA, Rosenfeld PJ. Antivascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol*. 2009; 20(3):158-65.
66. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR; VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med*. 2004; 30:2805-2816.
67. Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET Jr. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina*. 2004; 24(5):676-98.
68. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY; MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006; 355(14):1419-31.
69. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S; ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006; 355(14): 1432-44.
70. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T; ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009; 116(1):57-65.e5.
71. Gaudreault J, Fei D, Beyer JC, Ryan A, Rangell L, Shiu V *et al*. Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits. *Retina*. 2007; 27(9):1260-6.
72. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2005; 36(4):331-5.
73. Costa RA, Jorge R, Calucci D, Cardillo JA, Melo LA Jr, Scott IU. Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): results of a phase 1 dose-escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(10):4569-78.
74. Avery RL, Castellarin AA, Steinle NC *et al*. Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *Br J Ophthalmol* 2014;0:1-6.



75. 75.-Eichmann A, Simons M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 2012;24(2):188-193.
76. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38(3):258-268.
77. 77.-Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011;437(2):169-183.
78. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13(1):9-22.
79. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006;580(12):28-79-2887.
80. Carmeliet P, De SF, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and anti-angiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(6):315-326.
81. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-676.
82. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, *et al.* Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007;130(4):691-703.
83. Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with a potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 1991;53(3):411-414.
84. Tombran-Tink J, Li A, Johnson MA, Johnson LV, Chader GJ. Neurotrophic activity of interphotoreceptor matrix on human Y79 retinoblastoma cells. *J Comp Neurol* 1992;317(2):175-186.
85. Seigel GM, Tombran-Tink J, Becerra sP, Chader GJ, Diloreto DA, Fr., del CC, *et al.* Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. *Growth factors* 1994;10(4):289-297.
86. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, *et al.* Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248.
87. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Therapeutic prospects for PEDF: more than a promising angiogenesis inhibitor. *Trends Mol Med* 2003;9(6):244-250.
88. Sawant s, Aparicio S, Tink AR, Lara N, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Regulation of factors controlling angiogenesis in liver development: a role for PEDF in the formation and maintenance of normal vasculature. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(2):408-413.
89. Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker jT, Englander E, *et al.* Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* 1996;2:114-121.

90. Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ. Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood. Purification and characterization. *Biochem J* 2003;374:199-206.
91. Pollins EA, Legesse-Miller A, Haley EM, Goodpaster T, Randolph-Habecker J, Collier HA. Regulating the angiogenic balance in tissues. *Cell Cycle* 2008;7(13):2056-2070.
92. Tombran-Tink J, Aparicio s, Xu X, Tink AR, Lara N, Sawant S, *et al.* PEDF and the serpins: phylogeny, sequence conservation, and functional domains. *J Struct Biol* 2005;151(2):130-150.
93. Filleur S, Nelius T, de RW, Kennedy RC. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J Cell Biochem* 2009;106:769-775.
94. Shao H, Schwartz I, Shaltiel S. Secretion of pigment epithelium-derived factor. Mutagenic study. *Eur J Biochem* 2003;270(5):822-831.
95. Pignolo RJ, Francis MK, Rotenberg MO, Cristofalo VJ. Putative role for EPC-1/PEDF in the G0 growth arrest of human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol* 2003;195(1):12-20.
96. Hosomichi J, Yasui N, Koide T, Soma K, Morita I. Involvement of the collagen I-binding motif in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335(3):756-761.
97. Meyer C, Notari L, Becerra SP. Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* 2002;277(47):45400-45407.
98. Sekiya A, Okano-Kosugi H, Yamazaki CM, Koide T. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) shares binding sites in collagen with heparin/heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 2011;286(30):26364-26374.
99. Tombran-Tink J. The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF. New insights into phylogeny, function and signaling. *Front Biosci* 2005;10:2131-49.
100. Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 1995;15:4992-5003.
101. Valnickova Z, Petersen SV, Nielsen SB, Otzen DE, Enghild JJ. Heparin binding induces a conformational change in pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 2007;282(9):6661-6667.
102. Alberdi EM, Weldon JE, Becerra SP. Glycosaminoglycans in human retinoblastoma cells: heparan sulfate, a modulator of the pigment epithelium-derived factor-receptor interactions. *BMC Biochem* 2003;19:223-227.
103. Ek ET, Dass Cr, Choong PF. PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med* 2006;12(10):497-502.
104. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhib-

- its VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 2006;37(1):1-12.
105. Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(5):2593-2597.
  106. Chen L, Zhang SS, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. PEDF induces apoptosis in human endothelial cells by activating p38 MAP kinase dependent cleavage of multiple caspases. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348(4):1288-1295.
  107. Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T. Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells. *Life Sci* 2005;77(25):3231-3241.
  108. Shin ES, Sorenson CM, Sheibani N. PEDF expression regulates the pro-angiogenic and pro-inflammatory phenotype of the lung endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;44(3):422-426.
  109. Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. Pigment epithelium-derived factors inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem* 2006;281(6):3604-3613.
  110. Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, *et al.* Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 2002;8(4):349-357.
  111. Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, *et al.* Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 2003;9(6):774-780.
  112. Wang JJ, Zhang SX, Mott R, Knapp RR, Cao W, Lau K, *et al.* Salutary effect of pigment epithelium-derived factor in diabetic nephropathy: evidence for antifibrogenic activities. *Diabetes* 2006;55(6):1678-1685.
  113. Chung C, Shugrue C, Nagar A, Doll JA, Cornwell M, Gattu A, *et al.* Ethanol exposure depletes hepatic pigment epithelium-derived factor, a novel lipid regulator. *Gastroenterology* 2009;136(1):331-340.
  114. Ho TC, Chen SL, Shih SC, Wu JY, Han WH, Cheng HC, *et al.* Pigment epithelium-derived factor is an intrinsic antifibrosis factor targeting hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2010;177(4):1798-1811.
  115. Ueda S, Yamagishi S, Matsui T, Jinnouchi Y, Imaizumi T. Administration of pigment epithelium-derived factor inhibits left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 2011;178(2):591-598.
  116. Schmitz JC, Protiva P, Gattu AK, Utsumi T, Iwakiri Y, Neto AG, *et al.* Pigment epithelium-derived factor regulates early pancreatic fibrotic responses and suppresses the profibrotic cytokine thrombospondin-1. *Am J Pathol* 2011;179(6):2990-2999.

117. Cosgrove GP, Brown KK, Shciemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, *et al.* Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(3):242-251.
118. Cina DP, Xu H, Liu L, Farkas L, Farkas D, Kolb M, *et al.* Renal tubular angiogenic dysregulation in anti-Thy1 glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal* 2011;300(2):488-498.
119. Bernard A, Gao-Li J, Franco CA, Bouceba T, Huet A, Li Z. Laminin receptor involvement in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 2009;284(16):10480-10490.
120. Notari L, Baladron V, Roca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C, *et al.* Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 2006;281(49):38022-38037.
121. Ren JG, Jie C, Talbot C. How PEDF prevents angiogenesis: a hypothesized pathway. *Med Hypotheses* 2005;64(1):74-78.
122. Tombran-Tink J. The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling. *Front. Biosci.* 2005;10: 2131 -2149.
123. Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, *et al.* Novel mechanism for age-related macular degeneration: an Equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 2001;189(3):323-333.
124. Sonoda S, Sreekumar PG, Kase S, Spee C, Ryan S, kannan R, Hinton D. Attainment of polarity promotes growth factor secretion by retinal pigment epithelial cells: relevance to age-related macular degeneration. *Aging* 2010;2:28-42.
125. Xiaohong Z, *et al.* Anti-inflammatory effect of pigment epithelium-derived factor in DBA/2J mice. *Mol Vision* 2009; 15:438-450.
126. Tombran-Tink J. PEDF in angiogenic eye diseases. *Curr Mol Med.* 2010; 10(3):267-278.
127. Amaral J & Becerra P. Effects of human recombinant PEDF protein and PEDF-derived peptide 34-mer on choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:1318-1326.
128. Pennesi M, Neuringer M, Courtney R. Animal models of age related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):487-509.
129. Ryan SJ. The development of an experimental model of subretinal neovascularization in disciform macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1979; 77:707-745.
130. Dobi ET, Puliafito CA, Destro M. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1989; 107(2):264-269.
131. Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjani NL, Vinoses SA, Basilico C, Campochiaro PA. Targeted disruption of the FGF2 gene does

- not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol* 1998; 153(5):1641–1646.
132. Campos M, Amaral J, Becerra SP, Fariss RN. A novel imaging technique for experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(12):5163–5170.
  133. Giani A, Thanos A, Roh MI, Connolly E, Trichonas G, Kim I, Gragoudas E, Vavvas D, Miller JW. In vivo evaluation of laser-induced choroidal neovascularization using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6):3880–3887.
  134. Olson JL, Courtney RJ, Mandava N. Intravitreal infliximab and choroidal neovascularization in an animal model. *Arch. Ophthalmol.* 2007; 125(9):1221–1224.
  135. Campa C, Kasman I, Ye W, Lee WP, Fuh G, Ferrara N. Effects of an anti-VEGF-A monoclonal antibody on laser-induced choroidal neovascularization in mice: optimizing methods to quantify vascular changes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49(3):1178–1183.
  136. Semkova I, Peters S, Welsandt G, Janicki H, Jordan J, Schraermeyer U. Investigation of laser-induced choroidal neovascularization in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(12):5349–5354.
  137. Edelman JL, Castro MR. Quantitative image analysis of laser induced choroidal neovascularization in rat. *Exp. Eye Res.* 2000; 71(5):523–533.
  138. Miller H, Miller B, Ishibashi T, Ryan SJ. Pathogenesis of laser induced choroidal subretinal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1990a; 31(5):899–908.
  139. Ogata N, Matsushima M, Takada Y, Tobe T, Takahashi K, Yi X, Yamamoto C, Yamada H, Uyama M. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in developing choroidal neovascularization. *Curr. Eye Res.* 1996; 15(10):1008–1018.
  140. Yamada H, Yamada E, Kwak N, Ando A, Suzuki A, Esumi N, Zack DJ, Campochiaro PA. Cell injury unmasks a latent proangiogenic phenotype in mice with increased expression of FGF2 in the retina. *J. Cell. Physiol.* 2000; 185(1):135–142.
  141. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Hackett SF, Melia M, Kaleko M, Connelly S, Esumi N, Zack DJ, Campochiaro PA. Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization. *J. Cell. Physiol.* 2004; 201(3):393–400.
  142. Shen WY, Yu MJ, Barry CJ, Constable IJ, Rakoczy PE. Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat. *Br. J. Ophthalmol.* 1998; 82(9):1063–1071.
  143. Wada M, Ogata N, Otsuji T, Uyama M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR/flk-1) mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Curr. Eye Res.* 1999; 18(3):203–213.

144. Yi X, Ogata N, Komada M, Yamamoto C, Takahashi K, Omori K, Uyama M. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1997; 235(5):313–319.
145. Ando A, Yang A, Mori K, Yamada H, Yamada E, Takahashi K, Saikia J, Kim M, Melia M, Fishman M, Huang P, Campochiaro PA. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J. Cell. Physiol.* 2002; 191(1):116–124.
146. Berglin L, Sarman S, van der Ploeg I, Steen B, Ming Y, Itohara S, Seregard S, Kvanta A. Reduced choroidal neovascular membrane formation in matrix metalloproteinase-2-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(1):403–408.
147. Lambert V, Munaut C, Jost M, Noel A, Werb Z, Foidart JM, Rakic JM. Matrix metallose-9 contributes to choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2002; 161(4):1247–1253.
148. Seo MS, Kwak N, Ozaki H, Yamada H, Okamoto N, Yamada E, Fabbro D, Hofmann F, Wood JM, Campochiaro PA. Dramatic inhibition of retinal and choroidal neovascularization by oral administration of a kinase inhibitor. *Am. J. Pathol.* 1999; 154(6):1743–1753.
149. Zhu J, Wang YS, Zhang J, Zhao W, Yang XM, Li X, Jiang TS, Yao LB. Focal adhesion kinase signaling pathway participates in the formation of choroidal neovascularization and regulates the proliferation and migration of choroidal microvascular endothelial cells by acting through HIF-1 and VEGF expression in RPE cells. *Exp. Eye Res.* 2009; 88(5):910–918.
150. Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(8):3578–3585.
151. Zhang ZX, Wang YS, Shi YY, Hou HY, Zhang C, Cai Y, Dou GR, Yao LB, Li FY. Hypoxia specific SDF-1 expression by retinal pigment epithelium initiates bone marrow-derived cells to participate in Choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model. *Curr. Eye Res.* 2011; 36(9):838–849.
152. Bora NS, Kaliappan S, Jha P, Xu Q, Sohn JH, Dhaulakhandi DB, Kaplan HJ, Bora PS. Complement activation via alternative pathway is critical in the development of laser-induced choroidal neovascularization: role of factor B and factor H. *J. Immunol.* 2006; 177(3):1872–1878.
153. Lyzogubov VV, Tytarenko RG, Jha P, Liu J, Bora NS, Bora PS. Role of ocular complement factor H in a murine model of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2010; 177(4):1870–1880.
154. Ciulla TA, Criswell MH, Danis RP, Hill TE. Intravitreal triamcinolone acetate inhibits choroidal neovascularization in a laser-treated rat model. *Arch. Ophthalmol.* 2001; 119(3):399–404.
155. Kim SJ, Toma HS. Inhibition of choroidal neovascularization by intravitreal ketorolac. *Arch. Ophthalmol.* 2010; 128(5):596–600.
156. Lima e Silva R, Saishin Y, Akiyama H, Kachi S, Aslam S, Rogers B, Deering T, Gong YY, Hackett SF, Lai H, Frydman BJ, Valasinas A, Marton LJ, Campochiaro

- ro PA. Suppression and regression of choroidal neovascularization by polyamine analogues. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005; 46(9):3323–3330.
157. Olson JL, Courtney RJ, Rouhani B, Mandava N, Dinarello CA. Intravitreal anakinra inhibits choroidal neovascular membrane growth in a rat model. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2009; 17(3):195–200.
158. Zou Y, Xu X, Chiou GC. Effect of interleukin-1 blockers, CK112, and CK116 on rat experimental choroidal neovascularization *in vivo* and endothelial cell cultures *in vitro*. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2006; 22(1):19–25.
159. Rennel ES, Regula JT, Harper SJ, Thomas M, Klein C, Bates DO. A human neutralizing antibody specific to Ang-2 inhibits ocular angiogenesis. *Microcirculation.* 2011; 18(7):598–607.
160. Xie B, Shen J, Dong A, Rashid A, Stoller G, Campochiaro PA. Blockade of sphingosine-1-phosphate reduces macrophage influx and retinal and choroidal neovascularization. *J. Cell. Physiol.* 2009; 218(1):192–198.
161. Fu Y, Ponce ML, Thill M, Yuan P, Wang NS, Csaky KG. Angiogenesis inhibition and choroidal neovascularization suppression by sustained delivery of an integrin antagonist, EMD478761. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48(11):5184–5190.
162. Pan CK, Durairaj C, Kompella UB, Agwu O, Oliver SC, Quiroz-Mercado H, Mandava N, Olson JL. Comparison of long-acting bevacizumab formulations in the treatment of choroidal neovascularization in a rat model. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2011; 27(3):219–224.
163. Saishin Y, Takahashi K, Lima e Silva R, Hylton D, Rudge JS, Wiegand SJ, Campochiaro PA. VEGFTRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J. Cell. Physiol.* 2003; 195(2):241–248.
164. Balaggan KS, Binley K, Esapa M, MacLaren RE, Iqbal S, Duran Y, Pearson RA, Kan O, Barker SE, Smith AJ, Bainbridge JW, Naylor S, Ali RR. EIAV vector-mediated delivery of endostatin or angiostatin inhibits angiogenesis and vascular hyperpermeability in experimental CNV. *Gene Ther.* 2006; 13(15):1153–1165.
165. Lai CC, Wu WC, Chen SL, Xiao X, Tsai TC, Huan SJ, Chen TL, Tsai RJ, Tsao YP. Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing angiostatin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42(10):2401–2407.
166. Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, Duh E, Zack DJ, Li Q, Berns KI, Raisler BJ, Hauswirth WW, Campochiaro PA. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43(6):1994–2000.
167. Lu F, Adelman RA. Are intravitreal bevacizumab and ranibizumab effective in a rat model of choroidal neovascularization? *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2009a; 247(2):171–177.
168. Shen D, Wen R, Tuo J, Bojanowski CM, Chan CC. Exacerbation of retinal degeneration and choroidal neovascularization induced by subretinal injection of Matrigel in CCL2/MCP-1-deficient mice. *Ophthalmic Res.* 2006; 38(2):71–73.

169. Qiu G, Stewart JM, Sadda S, Freda R, Lee S, Guven D, de Juan E, Varner SE Jr. A new model of experimental subretinal neovascularization in the rabbit. *Exp. Eye Res.* 2006; 83(1):141–152.
170. Cao J, Zhao L, Li Y, Liu Y, Xiao W, Song Y, Luo L, Huang D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Wen R. A subretinal Matrigel<sup>®</sup> rat choroidal neovascularization (CNV) model and inhibition of CNV and associated inflammation and fibrosis by VEGF trap. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(11): 6009–6017.
171. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW, Schlingemann RO. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am. J. Pathol.* 1999; 155(2):421–428.
172. Baffi J, Byrnes G, Chan CC, Csaky KG. Choroidal neovascularization in the rat induced by adenovirus mediated expression of vascular endothelial growth factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41(11):3582–3589.
173. Spilbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2000; 157(1):135–144.
174. Wang F, Rendahl KG, Manning WC, Quiroz D, Coyne M, Miller SS. AAV-mediated expression of vascular endothelial growth factor induces choroidal neovascularization in rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(2):781–790.
175. Ohno-Matsui K, Hirose A, Yamamoto S, Saikia J, Okamoto N, Gehlbach P, Duh EJ, Hackett S, Chang M, Bok D, Zack DJ, Campochiaro PA. Inducible expression of vascular endothelial growth factor in adult mice causes severe proliferative retinopathy and retinal detachment. *Am. J. Pathol.* 2002; 160(2):711–719.
176. Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, Jousseaume AM, Fernandez A, Meyer TN, Poulaki V, Ma JJ, Redmond TM, Liu S, Adamis AP, D'Amato RJ. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am. J. Pathol.* 2001; 158(3):1161–1172.
177. Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, Elner VM, Elner SG, Sternberg P Jr. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol. Vis.* 2002; 8:119–126.
178. Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 40(9):1891–1898.
179. Jo YJ, Sonoda KH, Oshima Y, Takeda A, Kohno R, Yamada J, Hamuro J, Yang Y, Notomi S, Hisatomi T, Ishibashi T. Establishment of a new animal model of focal subretinal fibrosis that resembles disciform lesion in advanced age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52(9):6089–6095.



180. Wang L, Li CM, Rudolf M, Belyaeva OV, Chung BH, Messinger JD, Kedishvili NY, Curcio CA. Lipoprotein particles of intraocular origin in human Bruch membrane: an unusual lipid profile. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50(2):870–877.
181. Spaide RF, Ho-Spaide WC, Browne RW, Armstrong D. Characterization of peroxidized lipids in Bruch's membrane. *Retina.* 1999; 19(2):141–147.
182. Tamai K, Spaide RF, Ellis EA, Iwabuchi S, Ogura Y, Armstrong D. Lipid hydroperoxide stimulates subretinal choroidal neovascularization in the rabbit. *Exp. Eye Res.* 2002; 74(2):301–308.
183. Baba T, Bhutto IA, Merges C, Grebe R, Emmert D, McLeod DS, Armstrong D, Luttly GA. A rat model for choroidal neovascularization using subretinal lipid hydroperoxide injection. *Am. J. Pathol.* 2010; 176(6):3085–3097.
184. Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, Jha P, Nishihori H, Wang Y, Kaliappan S, Kaplan HJ, Bora NS. Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J. Immunol.* 2005; 174(1):491–497.
185. Lyzogubov VV, Tytarenko RG, Jha P, Liu J, Bora NS, Bora PS. Role of ocular complement factor H in a murine model of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2010; 177(4):1870–1880.
186. Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res* 2009; 26(5): 1197-216.
187. Kaplan HJ. Anatomy and function of the eye. *Chem Immunol Allergy* 2007; 92: 4-10.
188. Wade NJ. Image, eye, and retina (invited review). *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2007; 24(5): 1229-49.
189. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy* 2007; 92: 36-49.
190. Newell FW. *Ophthalmology, principles and concepts.* 5th ed. St. Louis: Mosby 1982, 559 p.
191. Ranta V-P, Mannermaa E, Lummeppuro K, Subrizi A, Laukkanen A, Antopolsky M, *et al.* Barrier analysis of periocular drug delivery to the posterior segment. *J Controlled Release* 2010; 148(1): 42-8.
192. Rhee DJ, Peck RE, Belmont J, Martidis A, Liu M, Chang J, *et al.* Intraocular pressure alterations following intravitreal triamcinolone acetonide. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(8): 999-1003.
193. Ozkiris A, Erkilic K. Complications of intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Can J Ophthalmol* 2005; 40(1): 63-8.
194. Thompson JT. Cataract formation and other complications of intravitreal triamcinolone for macular edema. *Am J Ophthalmol* 2006; 141(4): 629-37.
195. Jonas JB. Intravitreal triamcinolone acetonide: A change in a paradigm. *Ophthalmic Res* 2006; 38(4): 218-45.

196. Sanborn GE, Anand R, Torti RE, Nightingale SD, Cal SX, Yates B, *et al.* Sustained-release ganciclovir therapy for treatment of cytomegalovirus retinitis. Use of an intravitreal device. *Arch Ophthalmol* 1992; 110(2): 188-95.
197. Janoria KG, Gunda S, Boddu SH, Mitra AK. Novel approaches to retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2007; 4(4): 371-88.
198. Maurice DM. Drug delivery to the posterior segment from drops. *Surv Ophthalmol* 2002; 47 Suppl 1: S41-52.
199. Acheampong AA, Shackleton M, John B, Burke J, Wheeler L, Tang-Liu D. Distribution of brimonidine into anterior and posterior tissues of monkey, rabbit, and rat eyes. *Drug Metab Dispos* 2002; 30(4): 421-9.
200. Koevary SB, Nussey J, and Lake S. Accumulation of topically applied porcine insulin in the retina and optic nerve in normal and diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(3): 797-804.
201. Kent AR, Nussdorf JD, David R, Tyson F, Small D, Fellows D. Vitreous concentration of topically applied brimonidine tartrate 0.2%. *Ophthalmology* 2001; 108(4): 784-7.
202. Osborne NN, DeSantis L, Bae JH, Ugarte M, Wood JP, Nash MS, *et al.* Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischaemia to the retina. *Exp Eye Res*, 1999; 69(3): 331-42.
203. Acheampong AA, Shackleton M, Tang-Liu DD, Ding S, Stern ME, Decker R. Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs. *Curr Eye Res* 1999; 18(2): 91-103.
204. Okamura T, Kitamura Y, Uchiyama M, Toda M, Ayajiki K, Toda N. Canine retinal arterial and arteriolar dilatation induced by nipradilol, a possible glaucoma therapeutic. *Pharmacology* 1996; 53(5): 302-10.
205. Jager RD, Aiello LP, Patel SC *et al.* Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina* 2004; 24: 676-98.
206. Fung AE, Rosenfeld PJ. The International Bevacizumab safety Survey: using the Internet to assess drug safety Worldwide. *BJO* 2006; 90: 1344- 9.
207. Wu L, Martínez-Castellanos MA, Quiroz-Mercado H *et al.*, for the Pan American Collaborative Retina Group (PACORES). Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin(R)): results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246: 81-7.
208. Moshfeghi AA. Rate of endophthalmitis after anti-VEGF after intravitreal injection. *Retina Today* 2008; 2: 75-76.
209. Pilli S, Kotsolis A, Spaide RF, Slakter J, Freund KB, Sorenson J, Klancnik J, Cooney M. Endophthalmitis associated with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy injections in an office setting. *Am J Ophthalmol* 2008; 145: 879-82.

210. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr *et al.* Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004; 351: 2805-16.
211. Quiroz-Mercado H, Ustariz-González O, Martínez- Castellanos M, Covarrubias P, Dominguez F, Sanchez- Huerta V. Our Experience After 1765 Intravitreal Injections of Bevacizumab: The Importance of Being Part of a Developing Story. *Seminars in Ophthalmology* 2007; 22: 109-25.
212. Heier JS, Antoszyk AN, Pavan PR *et al.* Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a phase I/II multicenter, controlled, multidose study. *Ophthalmology* 2006; 113: 633-42.
213. Westfall AC, Osborn A, Kuhl D, Benz MS, Mieler WF, Holz ER. Acute Endophthalmitis Incidence. Intravitreal Triamcinolone. *Arch Ophthalmol* 2005; 123: 1075-7.
214. Moshfeghi DM, Kaiser PK, Scott IU *et al.* Acute endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide injection. *Am J Ophthalmol* 2003; 136: 791-6.
215. Jonisch J, Lai JC. Increased incidence of sterile endophthalmitis following intravitreal preserved triamcinolone. *BJO* 2008; 92: 1051-4.
216. Moshfeghi AA, Scott IU, Flynn HW Jr, Puliafito CA. Pseudohypopyon after intravitreal triamcinolone acetonide injection for cystoid macular edema. *Am J Ophthalmol* 2004; 138: 489-92.
217. Moshfeghi DM, Kaiser PK, Bakri SJ *et al.* Presumed sterile endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide injection. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 24-9.
218. Smith S. Basic ocular anatomy. *Insight* 2008; 33(3): 19-23; quiz 24-5.
219. Ghate D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2006; 3(2): 275-87.
220. Boddu SH, Gunda S, Earla R, Mitra AK. Ocular microdialysis: A continuous sampling technique to study pharmacokinetics and pharmacodynamics in the eye. *Bioanalysis* 2010; 2(3): 487-507.
221. Del Amo EM, Urtti A. Current and future ophthalmic drug delivery systems: A shift to the posterior segment. *Drug Discovery Today* 2008; 13(3, 4): 135-43.
222. Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin J-E, Wilson CG. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(14): 2010-32.
223. Thrimawithana TR, Young S, Bunt CR, Green C, Alany RG. Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discovery Today* 2011; 16(5-6): 270-7.
224. Urtti A, Salminen L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. *Surv Ophthalmol* 1993; 37(6): 435- 56.
225. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 662-85.

226. Colone M, Calcabrini A, Toccaceli L, Bozzuto G, Stringaro A, Gentile M, *et al.* The multidrug transporter P-glycoprotein: A mediator of melanoma invasion. *J Invest Dermatol* 2008; 128(4): 957-71.
227. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323(3): 466-83.
228. Saha P, Yang JJ, Lee VH. Existence of a p-glycoprotein drug efflux pump in cultured rabbit conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(7): 1221-6.
229. Maurice DM, Mishima S. Ocular pharmacokinetics, in *Handbook of experimental pharmacology*. M.L. Sears, Editor, Springer-Verlag: Berlin, New York 1984, 16-119.
230. Chung YB, Han K, Nishiura A, Lee VH. Ocular absorption of Pzpeptide and its effect on the ocular and systemic pharmacokinetics of topically applied drugs in the rabbit. *Pharm Res* 1998; 15(12): 1882-7.
231. Huang HS, Schoenwald RD, Lach JL. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents II: Assessment of barrier contributions. *J Pharm Sci* 1983; 72(11): 1272-9.
232. Hamalainen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtili A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(3): 627-34.
233. Guerrero A, Herrero R. Ocular drug absorption by topical route. Role of conjunctiva. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2008; 83: 683-6.
234. Kompella UB, Kadam RS, Lee VH. Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv* 2010; 1(3): 435-56.
235. Maurice DM, Mishima S. Ocular Pharmacokinetics, in *Pharmacology of the Eye*, M. Sears, Editor, Springer :Berlin Heidelberg 1984. 19-116.
236. Chien D-S, Homsy JJ, Gluchowski C, Tang-Liu DD. Corneal and conjunctival/scleral penetration of p-aminoclonidine, AGN 190342, and clonidine in rabbit Eyes. *Curr Eye Res* 1990; 9(11): 1051-9.
237. Maurice DM, Polgar J. Diffusion across the sclera. *Exp Eye Res* 1977; 25(6): 577-82.
238. Schoenwald RD, Deshpande GS, Rethwisch DG, Barfknecht CF. Penetration into the anterior chamber via the conjunctival/scleral pathway. *J Ocul Pharmacol Ther* 1997; 13(1): 41-59.
239. Ahmed I, Patton TF. Disposition of timolol and inulin in the rabbit eye following corneal versus non-corneal absorption. *Int J Pharm* 1987; 38(1-3): 9-21.
240. Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, *et al.* Topical nepafenac inhibits ocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(1):409-415.

241. Doukas J, Mahesh S, Umeda N, *et al.* Topical administration of a multi-targeted kinase inhibitor suppresses choroidal neovascularization and retinal edema. *J Cell Physiol.* 2008;216(1):29-37.
242. Campochiaro PA, Shah SM, Hafiz G, *et al.* Topical mecamlamine for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol.* 2010;149(5):839-851.
243. Iwase T, Oveson BC, Hashida N, *et al.* Topical pazopanib blocks VEGF-induced vascular leakage and neovascularization in the mouse retina but is ineffective in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(1):503-511.
244. Cloutier F, Lawrence M, Goody R, *et al.* Antiangiogenic activity of aganirsen in nonhuman primate and rodent models of retinal neovascular disease after topical administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(3):1195-1203.
245. Hernández C., García-Ramírez M, Corraliza L *et al.* Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes* 2013;62:2569-2578.
246. Pecen PE, Kaiser PK. Current phase 1/2 research for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 2015;26(3):188-193.
247. Velagaleti P, Anglade E, Khan J, Gilger BC, Mitra AK. Topical delivery of hydrophobic drugs using a novel mixed nanomicellar technology to treat diseases of the anterior & posterior segments of the eye. *Drug Deliv Technol* 2010; 10(4): 42-7.
248. Earla R, Boddu SH, Cholkar K, Hariharan S, Jwala J, Mitra AK. Development and validation of a fast and sensitive bioanalytical method for the quantitative determination of glucocorticoids quantitative measurement of dexamethasone in rabbit ocular matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 52(4): 525-33.
249. Boddu S, Gupta H, Patel S. Drug delivery to the back of the eye following topical administration: An update on research and patenting activity. *Recent patents on drug delivery & formulation* 2014;8,27.36.
250. Ogata N, *et al.* Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1168-1175.
251. Heier JS, *et al.* Evaluation of ranibizumab-induced changes in high resolution optical coherence tomographic retinal morphology and their impact on visual function. *Ophthalmology* 2006; 113(642):641-644.
252. Gutfleisch m, *et al.* Long-term visual outcome of pigment epithelial tears in association with anti-VEGF therapy of pigment epithelial detachment in AMD. *Eye* 2011;25:1181-6.
253. Arias L, *et al.* Manejo de las inyecciones intravítreas. Guías de práctica clínica de la SERV, 2012.
254. Martinez A, Sanchez-Salorio M. A comparison of the long-term effects of dorzolamide 2% and brinzolamide 1%, each added to timolol 0.5%, on retrobulbar

- hemodynamics and intraocular pressure in open-angle glaucoma patients. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009; 25(3): 239-48.
255. Pontes de Carvalho RA, Krausse ML, Murphree AL, Schmitt EE, Campochiaro PA, Maumenee IH. Delivery from episcleral explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(10):4532-4539.
256. Edelhauser HF, Rowe-Rendleman CL, Robinson MR, *et al*. Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: basic research to clinical applications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(11):5403-5420.
257. Kato A, Kimura H, Okabe K, Okabe J, Kunou N, Ogura Y. Feasibility of drug delivery to the posterior pole of the rabbit eye with an episcleral implant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(1):238-244.
258. Khalili A, Paull D, Ellis JS, Dhingra S, Khaw PT, Brocchini S. Prolonged local ocular delivery of an antibody. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50: e-abstract 5992.
259. Jaffe GJ, Martin D, Callanan D, Pearson PA, Levy B, Comstock T; Fluocinolone Acetonide Uveitis Study Group. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis: thirty-four-week results of a multicenter randomized clinical study. *Ophthalmology*. 2006;113(6):1020-1027.
260. Zhang K, Hopkins JJ, Heier JS, *et al*. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(15): 6241-6245.
261. Campochiaro P. Sustained Release Corticosteroid for DME. Paper presented at: Angiogenesis, Exudation and Degeneration 2011; February 12, 2011; Miami, FL.
262. Dugel PU, Cantrill HL, Elliott D, *et al*. Clinical safety and preliminary efficacy of an intravitreal triamcinolone implant (I-vation TA) in DME. Poster presented at: the Association for Research in Vision and Ophthalmology; May 6-10, 2007; Fort Lauderdale, FL. Abstract 1413.
263. Lowder CY, Belfort Jr R, Lightman S, *et al*, for the Ozurdex HURON Study Group. Dexamethasone intravitreal implant for noninfectious intermediate or posterior uveitis. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(5):545-553.
264. Li P-Y, Shih J, Lo R, *et al*. An electrochemical intraocular drug delivery device. *Sens Actuators A Phys*. 2008;143(1):41-48.
265. Kuno N, Fujii S. Recent Advances in Ocular Drug Delivery Systems. *Polymers* 2011;3,193-221.
266. Eljarrat-Binstock E, Domb AJ. Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery. *J Control Release*. 2006;110(3):479-489.
267. Patel SR, Lin AS, Edelhauser HF, Prausnitz MR. Suprachoroidal drug delivery to the back of the eye using hollow microneedles. *Pharm Res*. 2011;28(1): 166-176.

268. Olsen TW, Feng X, Wabner K, *et al.* Cannulation of the suprachoroidal space: a novel drug delivery methodology to the posterior segment. *Am J Ophthalmol.* 2006;142(5):777-787.
269. Tetz M, Rizzo S, Augustin AJ. Safety of submacular suprachoroidal drug administration via a microcatheter: retrospective analysis of European treatment results. *Ophthalmologica.* 2012;227(4):183-189.
270. Safety and Efficacy Study of rAAV.sFlt-1 in patients with Exudative age-related macular degeneration (AMD). <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01494805>. Accessed July 17, 2013.
271. Hou Q, Tang J, Wang Z, Wang C, Chen X, Hou L, Dong XD, Tu L. Inhibitory effect of microRNA-34a on retinal pigment epithelial cell proliferation and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(10):6481-8.
272. Renno R, Ayman Y, Michaud N, Gragoudas E, Miller J. Expression of pigment epithelium-derived factor in experimental choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2002; 43(5):1574-80.
273. Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, *et al.* Pigment epithelium derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2006;82:99-110.
274. Mori K, Duh E, Gehlbach P, *et al.* Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol.* 2001;188:253-263.
275. Mori K, Gehlbach P, Ando A, McVey D, Wei L, Campochiaro PA. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium derived factor. *Invest Ophthalmol Vis sci.* 2002;43:2428-2434.
276. Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, *et al.* AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1994-2000.
277. Saishin Y, Silva RL, Saishin Y, *et al.* Periocular gene transfer of pigment epithelium derived factor inhibits choroidal neovascularization in a human-sized eye. *Hum Gene Ther.* 2005;16:473-478.





# Anexo

---

Comité ético de aprobación del estudio.  
Memoria descriptiva.





## COMITÉ ÉTICO DE APROBACIÓN DEL ESTUDIO

**Núm. Registre: 61/14 CEEA**

### **MEMÒRIA DESCRIPTIVA**

- Procediment d'**INVESTIGACIÓ**  
 Procediment de **DOCÈNCIA**
- Procediment de **Notificació Prèvia**  
 Procediment d'**Autorització Expressa**
- Finançament per organisme o convocatòria **pública**. Especificar: Beca FIS P113/00960
- Finançament per organisme o convocatòria **privada**. Especificar:

**1. TÍTOL DEL PROJECTE:** Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) en el tratamiento de la neovascularización coroidea en modelo animal de degeneración macular asociada a la edad

**TÍTOL DEL PROCEDIMENT:** Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) en el tratamiento de la neovascularización coroidea en modelo murino de degeneración macular asociada a la edad

### **2. DADES DEL PERSONAL INVESTIGADOR RESPONSABLE**

Nom i cognoms: José García-Arumí

NIF: 36962523M  
3000

e-mail: 17215jga@comb.es

Telèfon/ext.: 93 489

Grup d'Investigació: OFTALMOLOGIA

Institut/Centre: Vall d'Hebron Institut de Recerca



#### PERSONAL IMPLICAT EN EL PROCEDIMENT

Nom i cognoms	NIF	Acreditació (I – E*)
Miguel Ángel Zapata Victori	36962523M	I
Anna Salas Torras	45642276H	I
Laura Fontrodona Montals	77617765X	I
Josep Badal Lafulla	39360057L	I
Bárbara Ferreira De Souza	36582648K	E

\* I investigador E experimentador

#### 3. SEGUEIX ALGUNA LÍNIA DIRECTRIU OFICIAL?

S'entén per línia directriu oficial aquella que apareix en el DOGC, BOE, DOCE..., o altres publicacions d'administracions organismes públics (FDA, EMEA, ...).

Sí; especificar quina i adjuntar una fotocòpia:

No, ni existeixen publicacions que utilitzin un disseny similar.

No, però s'adjunten fotocòpies de publicacions que utilitzen un disseny similar (PDF o en el seu defecte, fotocòpies).

#### Títols de les publicacions que utilitzen un disseny similar:

Hyeong Gon Yu et al, Increased Choroidal Neovascularization following Laser Induction in Mice Lacking Lysyl Oxidase-like 1. IOVS. 2008;6:2599-2605.

Amaral J & Becerra SP, Effects of Human Recombinant PEDF Protein and PEDFDerived Peptide 34-mer on Choroidal Neovascularization. IOVS. 2010;51:1318-1326.

Ebrahim Q et al, Increased neovascularization in mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3. IOVS10-5899; published ahead of print January 31, 2011, doi:10.1167/iovs.10-5899

Tomida et al, Suppression of choroidal neovascularization and quantitative and qualitative inhibition of VEGF and CCL2 by heparin. IOVS10-6737; published ahead of print February 4, 2011, doi:10.1167/iovs.10-6737

#### 4. ANTECEDENTS (màx. 1 pàg.)

Resum dels antecedents utilitzant un vocabulari no excessivament tècnic.

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una de las principales patologías que causa ceguera legal en los adultos de los países desarrollados. En personas de más de 65 años es la principal causa de ceguera (Macular Photocoagulation study Group 1991); en Estados Unidos se estima que casi el 10% de la población mayor de 65 años sufre esta



enfermedad en alguno de sus grados, y la prevalencia se hace mayor llegando casi hasta el 20% en pacientes mayores de 75 años.

Se clasifica en dos grupos: no exudativo (“seco”) y exudativo (“húmedo”). En su forma exudativa, aparecen membranas de neovascularización, normalmente de origen coroideo, produciendo exudación de fluido, hemorragias, edema macular y en estadios finales muerte de los fotorreceptores y fibrosis subretiniana que conlleva una pérdida permanente y considerable de la agudeza visual de los pacientes sin presentar dolor.

La angiogénesis ocular está controlada por el equilibrio entre los factores que estimulan o inhiben la formación de nuevos vasos. En la DMAE el aumento de los niveles de “Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGF) (Roh et al, Retina. 2009) junto con la disminución de los niveles de “Pigment Epithelium Derived Factor” (PEDF) es responsable de la patogenia de la neovascularización coroidea (Bhutto IA et al. Exp Eye Res. 2006;82(1):99-110).

El PEDF es una glicoproteína que representa el factor antiangiogénico más potente en el ojo (Sheikpranbabu et al Life Sci. 2009. 85(21-22):719-731), y también tiene efecto neurotrófico y antiinflamatorio (Xiaohong et al. Mol Vision 2009;15:438-450; McLeod DS et al. 2006 Exp Eye Res. 2006;82(1):99-110). Actualmente está considerado como posible diana terapéutica en la prevención de la muerte de las células de la retina y contrarrestar el crecimiento de vasos anormales inducidos por el VEGF (Tombran-Tink J. Curr Mol Med. 2010;10(3):267-278).

Recientemente se ha demostrado que la administración subconjuntival diaria de la proteína humana recombinante PEDF así como el péptido sintético del PEDF 34-mer, derivado de las posiciones Asp44-Asn77 es capaz de reducir las lesiones neovasculares coroideas en el 52% y 47% respectivamente en modelos animales in vivo (Amaral J & Becerra P. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51:1318-1326).

Otra forma de proveer la liberación en dosis continuas y a largo plazo es la administración intravítrea de un polímero biodegradable impregnado del fármaco.

## 5. OBJECTIUS

Descriure els principals objectius que es pretenen assolir, explicar la seva aplicabilitat y possibilitat de patent.

- 1) Evaluar y comparar la eficacia de 2 fracciones del péptido PEDF sintéticas desarrolladas por la empresa BCNpeptides, diferentes a la fracción 44-mer, en administración tópica en el control o disminución de la neovascularización coroidea.

## 6. DEFINICIÓ I JUSTIFICACIÓ DE L'ANIMAL SELECCIONAT

### 6.1 Definició:

Model Animal: Neovascularización coroidea inducida  
 (Animal que té una malaltia que és la mateixa o similar a una malaltia en els essers humans).  
 Animal: Ratón  
 Soca o raça: C57BL/6J  
 Sexe: macho  
 Edat o Pes: 10-12 semanas  
 Tipus d'OGM: TG  KO  KI  Mutant  Altres   
 (Organisme Genèticament Modificat)  
 Condicional  Induïble

6.2. Justificar els motius d'aquesta selecció i que el model animal proposat és el de menor nivell de sensibilitat neurovegetativa que permet assolir els objectius:

<http://www.ccac.ca/en/alternatives/reduction/theme03.html>



## 7. DISSENY I METODOLOGIA

Descriure de forma seqüencial: les fases i la seva durada; els grups experimentals amb el nombre d'animals en cadascú; els tractaments i les manipulacions a què seran sotmesos els animals.

### Modelo animal de neovascularización coroidea (NVC):

La NVC será inducida por lesión con láser en la membrana de Bruch en ratones adultos (10-12 semanas) C57BL/6j.

Los ratones serán anestesiados con isoflurano, las pupilas serán dilatadas con 1 gota de tropicamida 0,5%. La fotocoagulación con láser se realizará mediante el equipo MicronIII, realizando 4 aplicaciones (75- $\mu$ m de tamaño; 0.1 s duración; 600 mW) en cada ojo en las posiciones de 3, 9, 6 y 12 horas (posición reloj) en el polo posterior en la misma distancia del nervio óptico.

El desarrollo de los vasos será monitorizado mediante realización de angiografía fluoresceínica (AF) con el equipo MicronIII cada 2 días, para determinar la progresión de las lesiones.

### Experimento de puesta a punto del modelo de NVC:

Para determinar la evolución de las lesiones creadas por nuestro sistema de lesión con láser, se va a realizar un primer experimento:

Grupo	Láser	Pruebas in vivo	Día eutanasia	Nº animales
1	250 mW, 100 ms	AF en día eutanasia	1	6
2	250 mW, 100 ms	AF en día eutanasia	2	6
3	250 mW, 100 ms	AF en día eutanasia	3	6
4	250 mW, 100 ms	AF en día eutanasia	5	6
5	250 mW, 100 ms	AF en día eutanasia	7	6
6	250 mW, 100 ms	AF cada 2 días	14	6
7 Control sin láser	--		14	6
Total nº animales				42

Después de cada eutanasia, los ojos de los ratones serán enucleados. Cada ojo derecho se usará para realizar inmunofluorescencia en "flat-mount" para la detección de las lesiones y la posible neovascularización. Cada ojo izquierdo será usado para extracción de RNA y RT-PCR para el estudio de la expresión génica de varios genes pro- y anti-angiogénicos, así como genes relacionados con la inflamación y la apoptosis.

Este primer experimento nos servirá para determinar el mejor punto de análisis post-lesión, así como para evaluar la eficacia de la generación del modelo y sus potenciales incidencias, datos que se usarán para el ajuste de la n en los experimentos posteriores.

Criterios de exclusión de animales:

- provocación de hemorragia intravítrea o sub-retiniana en el momento de la realización de las lesiones.
- Desarrollo anormal de las lesiones (unión de dos lesiones creando una macro-lesión).
- No desarrollo de lesión en el sitio donde se ha aplicado el láser.



La neovascularización coroidea (NVC) es una invasión aberrante de estructuras vasculares de la coroides debajo de la neuro-retina. Ocurre generalmente en la región macular y causa un compromiso severo de la visión. La forma exudativa de la DMAE es caracterizada por esta lesión. El mecanismo patológico de la NVC no está aún determinado (Ambati et al 2003, Hollyfield et al 2008).

El modelo animal de NVC inducida por láser es el modelo más aceptado para el estudio de la DMAE, pues presenta muchos aspectos similares importantes a la DMAE exudativa. Como ejemplo, la acumulación de macrófagos en el sitio de la lesión (Humphrey et al 1996 & Sakurai et al 2006), el aumento de expresión de VEGF, que lleva a la NVC (X Yi et al 1997, Sakurai et al 2006, Tomida et al 2011), y liberación de otras citocinas inflamatorias como el TNF $\alpha$  que también ha sido relacionado con la formación de la NVC inducida por láser (Shi X et al 2006).

Fueron descritos la utilización de diversos animales como modelos de NVC inducida por láser. Entre ellos el conejo (Humphrey et al 1996), la rata (Yi X et al 1997) y el ratón (Hyeong Gon Yu et al 2008, Ebrahim Q et al 2011, Tomida et al 2011) son los más citados. El modelo animal de menor nivel de sensibilidad neurovegetativa de la NVC y que presenta mayores similitudes con los humanos es el ratón. Utilizado en la mayoría de los estudios de DMAE exudativa.

#### BIBLIOGRAFÍA

Humphrey MF, Moore SR. Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. *Glia*.1996;16:325-341.

Yi X, et al. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol*.1997;235:313-319

Ambati J, et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv.Ophthalmol*.2003;48:257-293

Sakurai E, et al. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *IOVS*.2003;44:3578-3585

Shi X, et al. Inhibition of TNF-alpha reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Exp.Eye Res*.2006;83:1325-1334.

Hollyfield JG, et al. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat.Med*.2008;14:194-198.

Hyeong Gon Yu et al, Increased Choroidal Neovascularization following Laser Induction in Mice Lacking Lysyl Oxidase-like 1. *IOVS*. 2008;6:2599-2605.

Ebrahim Q et al, Increased neovascularization in mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *IOVS*10-5899; published ahead of print January 31, 2011, doi:10.1167/iovs.10-5899

Tomida et al, Suppression of choroidal neovascularization and quantitative and qualitative inhibition of VEGF and CCL2 by heparin. *IOVS*10-6737; published ahead of print February 4, 2011, doi:10.1167/iovs.10-6737



**Experimento de estudio de la administración tópica de los fármacos:**

La solución de los péptidos sintéticos del PEDF (faPEDF3 y faPEDF5) será diluida en tampón fosfato (PBS) y esterilizada por filtración. Las diluciones serán preparadas a una concentración de 0.1 mM en un volumen de 2 µL por animal. En los animales control será administrado 2 µL de PBS. La administración de los tratamientos se realizará con micropipeta sobre la córnea o el lagrimal de los dos ojos, con el animal despierto inmovilizado manualmente. El tratamiento se aplicará diariamente, hasta la eutanasia. Los animales serán divididos en 3 grupos entre tratamiento y control compuestos de 6 animales por grupo.

Grupo	Tratamiento	Primer día administración	Último día administración	Día eutanasia	Nº animales
1	faPEDF (3 1mg/ml)	1	*	*	6**
2	faPEDF (3 10mg/ml)	1	*	*	6**
3	PBS	1	*	*	6**
Total nº animales					18**

\* Día de eutanasia determinado en experimento anterior (no más de 14 días)

\*\* El número de animales puede variar dependiendo de los resultados obtenidos en el experimento de puesta a punto del modelo.

Todos los animales serán eutanasiados con CO<sub>2</sub> según el protocolo estándar establecido en el animalario. En 3 animales de cada grupo los ojos serán enucleados y los neovasos serán visualizados con microscopía confocal utilizando "flat mount" de la coroides/EPR marcados con IB4 isolectina conjugada con un fluorocromo (Alexa fluor 568) para la identificación de las células endoteliales. Los neovasos serán cuantificados utilizando un software de imagen 3D (Velocity, PerkinElmer, Wellesley, MA). El resto de globos oculares serán diseccionados y las retinas serán aisladas para extracción de RNA y RT-PCR. Se analizará la expresión diferencial de genes pro- y anti-angiogénicos, inflamatorios y apoptóticos.

**7.1 Nombre d'animals:**

<http://www.ccac.ca/en/alternatives/reduction/theme01.html>

Nombre total d'animals a utilitzar en el procediment: 60

Es posible que durante el estudio haya un cambio en el número de animales por diversos factores como: no obtención de la neovascularización, muerte de algún animal post anestesia o complicaciones oculares (endoftalmítis). Estimamos que pueda haber un incremento de aproximadamente 10% debido a estos factores, o mayor (+ 18 animales) si se tiene que repetir el experimento de tratamiento por completo debido a una falta de efecto del péptido y necesidad de re-ajuste de concentración. En este último caso, se partirá de la dosis máxima para maximizar la probabilidad de obtener efectos del tratamiento. En caso que no se obtuvieran buenos resultados se concluiría el tratamiento como no efectivo y se pensaría en desarrollar otros péptidos; si da resultados positivos, se puede valorar de repetir experimentos para el estudio de posibles efectos tóxicos así como el ajuste de dosis.

Indicar si aquests animals ja havien estat utilitzats prèviament en un altre procediment:

No





Sí; especificar en quin:

**7.2 Durada del procediment:**

Temps que passa des de la primera manipulació de l'animal fins a la seva eutanàsia.

Entre 1 y 14 días.

**7.3 Justificació del nombre d'animals per procediment:**

Especificar els paràmetres a analitzar i raonar el nombre d'animals en base a criteris estadístics i/o referències bibliogràfiques que avalin aquest nombre, o en funció del nombre d'alumnes, si es tracta d'un procediment de docència.

En publicaciones previas el número de animales utilizados por grupo de estudio es en su mayoría 10. Un artículo reciente utilizó 5 animales por grupo de NVC inducida por láser con éxito (Ebrahem Q et al, 2011).

La n mínima en nuestro estudio será de 5 animales (10 ojos). Prevemos un 10% de incidencias asociadas a la técnica de inducción de la lesión. Aplicando la fórmula de incidencias secuenciales,

$$X = N / (A/100 * B/100 \dots \text{etc})$$

Donde:

X= nº final de animales por grupo

N= n mínima estadísticamente

A= 100 - % incidencia 1 B= 100 - % incidencia 2

C= idem y así sucesivamente

$$X = 5 / (90/100) = 5,55 = 6$$

Krishnamoorthy V et al. Intravitreal Injection of Fluorochrome-Conjugated Peanut Agglutinin Results in Specific and Reversible Labeling of Mammalian Cones In Vivo. IOVS 2008;49:2643–2650.

Hyeong Gon Yu et al, Increased Choroidal Neovascularization following Laser Induction in Mice Lacking Lysyl Oxidase-like 1. IOVS 2008;49:2599–2605

Ebrahem Q et al, Increased neovascularization in mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3. IOVS10-5899; published ahead of print January 31, 2011, doi:10.1167/iavs.10-5899

**7.4 Anestèsia i Analgèsia**

[http://www.ccac.ca/en/alternatives/refinement\\_raffinement/theme02.html](http://www.ccac.ca/en/alternatives/refinement_raffinement/theme02.html)

[http://www.ccac.ca/en/alternatives/refinement\\_raffinement/theme03.html](http://www.ccac.ca/en/alternatives/refinement_raffinement/theme03.html)

- No, en cap moment, ja que el procediment no ho requereix.
- No, en cap moment, ja que és incompatible amb el procediment.
- Sí: omplir el quadre següent

Fase	Producte* (principi actiu, no	Via	Dosi	Freqüència
------	----------------------------------	-----	------	------------



	comercial)			
Anestesia	Isoflurano	Aérea	2%	1 ó 6
Anestesia	Prescaína 0.4%	Tópico	1 gota	1 ó 6

Monitoratge de l'anestèsia: Reflejos estaci3n, palpebral y temperatura.

### 7.5 Dejuni

- No, en cap moment.  
 Sí: omplir el quadre següent.

Fase	Aliment	Aigua	Hora d'inici	Hora final	Durada (h)
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			

Suplementacions:

### 7.6 Administracions de productes químics i biol3gics

<http://www.secal.es/ficheros/ficheros/28/Refinamiento%20administracion%20sustancias.pdf>

<http://www.lal.org.uk/pdf/files/refinement.pdf>

- No, en cap moment.  
 Sí: omplir el quadre següent.

Producte*	Via	Freqüència d'administració	Volum o concentració	Dosi
Péptido sintético faPEDF (3 1mg/ml)	Topica/colirio	diario	1 gota de 2 ul	1 mM
Péptido sintético faPEDF (3 10mg/ml)	Tópica/colirio	Diario	1 gota de 2 ul	1 mM
PBS (vehiculo)	Tópica/colirio	Diario	2 ul	

\*Principi actiu, no comercial

### 7.7 Extracci3n de sang

<http://www.secal.es/ficheros/ficheros/22/Refinamiento%20extraccion%20sangre.pdf>

<http://www.secal.es/ficheros/ficheros/29/Safena.pdf>

[http://www.ccac.ca/en/alternatives/refinement\\_refinement/theme04.html](http://www.ccac.ca/en/alternatives/refinement_refinement/theme04.html)

<http://www.lal.org.uk/pdf/files/BLOOD.PDF>

<http://www.lal.org.uk/pdf/files/LAB1607.PDF>

- No, en cap moment.  
 Sí: omplir el quadre següent.

Via d'extracci3n	Volum de cada extracci3n	Freqüència d'extracci3n

## 8. SUPERVISI3N DELS ANIMALS



**8.1 Classificar la severitat de les diferents fases del procediment dins de les quatre categories: sense recuperació, lleu, moderat i sever; en base al grau de dolor, patiment, angoixa o danys perdurables que puguin experimentar els animals en el procediment.**

Expert working Group on severity classification of scientific procedures performed on animals:  
[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/report\\_ewg.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/report_ewg.pdf)  
<http://www.lal.org.uk/pdf/FelasaPain.pdf>

Fase de creació de la neovascularització coroidea: MODERADO  
 Aplicació tòpica de los péptidos: LEVE

**8.2 Protocol de supervisió: ADJUNTAR document per al seguiment dels animals.**

**ANNEX 1**

Per detectar situacions anteriors, indicant: paràmetres a controlar, freqüència de supervisió, personal que el realitza i quines mesures correctores estan previstes aplicar.

**8.3 Criteris de punt final**

Indicar, si es necessari, quins seran els motius i/o criteris d'aplicació d'eutanàsia abans de finalitzar el procediment si l'estat de l'animal el requereix.

<http://www.secal.es/ficheros/ficheros/34/Punto%20final.pdf>  
[http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GDLINES/ENDPTS/g\\_endpoints.pdf](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/ENDPTS/g_endpoints.pdf)  
[http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarjournal/41\\_2/](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/41_2/)  
[http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/4f7adc214b91a685c12569fa005d0ee7/c125692700623b74c12569bb005aa3d5/\\$FILE/00087372.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/4f7adc214b91a685c12569fa005d0ee7/c125692700623b74c12569bb005aa3d5/$FILE/00087372.PDF)  
<http://www.lal.org.uk/endpoints.php>

En base al procedimiento no se espera ningún criterio de punto final,. Entretanto, los animales serán evaluados diariamente durante todo el procedimiento en el momento de la administración de los fármacos. Si se da alguna alteración de carácter infeccioso en el ojo (endofthalmitis) los animales serán eutanasiados.

**9. FINALIZACIÓ DEL PROCEDIMENT**

**9.1 En finalitzar el procediment està previst:**

- Mantenir els animals vius amb la finalitat de (explicar els motius):  
 Eutanàsia dels animals.

**9.2. Tècnica d'eutanàsia / puntuació**

- Isoflurà - Sobredosi d'anestèsic, sedant prèviament l'animal / 5  
 Pentobarbital - Sobredosi d'anestèsic, sedant prèviament l'animal / 5  
 Dislocació cervical (rosegadors <150g) / 4  
 Asfíxia per CO<sub>2</sub> >70% / 4  
 Decapitació / 2  
 Exsanguinació sota anestèsia / mètode acceptat sense puntuació  
 La realització del procediment implica la mort del animal  
 Altres: Puntuació:



Si el mètode proposat no té una puntuació de 4 ó 5 és necessari justificar l'estricta necessitat d'utilitzar la tècnica proposada:

Segons les Recomanacions que es basen en el document publicat per FELASA en *Laboratory Animals* (1996) Vol.30(4):293-316 *Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación, parte 1 y parte 2*

<http://www.secal.es/ficheros/ficheros/26/Eutanasia1.pdf>

<http://www.secal.es/ficheros/ficheros/27/Eutanasia2.pdf>

[http://www.ccac.ca/en/alternatives/refinement\\_raffinement/theme09.html](http://www.ccac.ca/en/alternatives/refinement_raffinement/theme09.html)

[http://www.lal.org.uk/index.php?option=com\\_content&view=article&id=56&Itemid=60](http://www.lal.org.uk/index.php?option=com_content&view=article&id=56&Itemid=60)

### 9.3. Tècnica eutanàsia per sacrificar els animals descartats del procediment en base a criteris de punt final (si és diferent de l'anterior)

Tècnica:

Puntuació:

## 10. MÈTODES ALTERNATIUS

Són mètodes que no impliquen la utilització de l'animal, permeten reduir el nombre a utilitzar o comporten un menor grau de patiment de l'animal

### 10.1 Indicar els motius pels quals no es planteja aplicar un mètode alternatiu al procediment proposat:

- El mètode proposat és un mètode alternatiu.
- No existeix cap mètode alternatiu al procediment proposat.
- Existeixen mètodes alternatius, però no estan validats.
- Altres motius: (especificar detalladament):

### 10.2 Descriure el treball realitzat per garantir l'aplicació de les 3 Rs (Reemplaçament, Refinament i Reducció dels animals) en aquest procediment:

<http://www.ccac.ca/en/alternatives/intro.html>

El modelo animal utilizado en este estudio es el de menor nivel de sensibilidad neurovegetativa, reemplazando otros modelos como conejos, cerdos, perros etc. Todos los procedimientos quirúrgicos serán realizados por personal cualificado y con experiencia en procedimientos del segmento posterior en ratones, el que disminuye el número de animales utilizados en el estudio pues la probabilidad de éxito es alta. Todos los animales serán manipulados por personal cualificado disminuyendo las probabilidades de estrés de los animales. Todos los procedimientos serán realizados después de adecuada anestesia y así los animales no sufrirán ningún dolor en ninguna fase del estudio. En este estudio estamos utilizando el número mínimo de animales por grupo descrito en bibliografía previa.

## 11. INSTAL·LACIONS

Indicar el lloc on es mantindran els animals durant el procediment.: Vall d'Hebron Institut de Recerca

Número de Registre DMAH (Departament de Medi Ambient i Habitatge): B9900062



La persona que signa en qualitat de personal investigador responsable d'aquest procediment, informa:

Que coneix i complirà la legislació i altres normes reguladores de la utilització d'animals per a investigació i docència.

Que és conscient que aquest procediment proposat no pot ser iniciat fins que es compleixin tots aquests requisits:

- 1 El CEEA (Comitè Ètic d'Experimentació Animal) informi favorablement el procediment proposat.
- 2 Es trameti al DMAH (Departament de Medi Ambient i Habitatge) la Memòria Descriptiva del Procediment, l'informe del CEEA i el full de Notificació Prèvia de Procediments.
- 3 El DMAH hagi concedit, si és el cas, l'Autorització Expressa per a aquells casos que el requereixin.
- 4 En cas de ser aprovat el procediment, es compromet a tramitar anualment la documentació que a efectes estadístics pugui requerir el DMAH.
- 5 Sol·licitar un nou informe al CEEA i una nova autorització al DMAH, si és necessari, prèviament a la introducció de qualsevol canvi rellevant en el protocol i informació que aquí es presenta.

Nom i cognoms: José García-Arumí

Lloc i data: Barcelona 20/8/2014



## ADJUNTAR DOCUMENT PER AL SEGUIMENT DELS ANIMALS

Evaluación de los animales durante el estudio.

PARAMETRO **	INDICACIONES	PUNTUACIÓN	FRECUENCIA
Peso cambios *	Normal	0	2 v/sem
	<10% pérdida peso	1	
	10-20% pérdida peso	2	
	>20% pérdida peso	3	
Condición corporal *	Buena: vertebras, huesos pélvico o espinal no prominentes	0	diario
	Regular: evidencia de segmentación de columna vertebral, huesos pélvicos palpable	1	
	Emanciación: esqueleto extremadamente marcado, poca o ninguna carne para cubrir	3	
Apariencia física	Normal	0	diario
	Desaparece acicalamiento	1	
	Pelaje en mal estado/secreciones nasales	2	
	Pelaje en muy mal estado, postura anormal	3	
Comportamiento	Normal	0	diario
	Cambios menores: débil	1	
	Anormal: movilidad reducida, inactivo	2	
	Inmovil o muy quieto, vocalizaciones, automutilaciones	3	
Alteraciones oculares	Epífora	1	diario
	Blefaroespasma	1	
	Hiperemia conjuntival	1	
	Endoftalmitis	3	
Medidas correctoras: epífora y blefaroespasma (administración de 1 gota de tropicamida – midriático/cicloplejico)			
Investigadores responsables por la evaluación de los animales: Anna Salas; Bárbara Ferreira			
Cuando se obtiene una puntuación de 3 en un parámetro o de 8 en parámetros combinados el animal debe ser eutanasiado			

### **Sobre el autor**

Josep Badal Lafulla es licenciado en Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona y posteriormente obtuvo una plaza MIR de residente de Oftalmología en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona.

Continuó su formación en la subespecialidad de retina y vítreo, y actualmente desarrolla su actividad profesional en el campo de la retina médica y quirúrgica.

El presente trabajo es el resultado de la investigación de nuevos tratamientos para la degeneración macular asociada a la edad, una de las principales causas de ceguera en el mundo.

