



# ARCHIVOS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OFTALMOLOGÍA

www.elsevier.es/oftalmologia



## Artículo original

# Análisis morfométrico del endotelio corneal tras ranibizumab intravítreo en la degeneración macular asociada a la edad

J. Benítez-Herreros, C. Pérez-Rico\*, M.A. Teus, Y. Gómez-San Gil y M. Castro-Rebollo

Servicio de Oftalmología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 13 de mayo de 2010

Aceptado el 3 de septiembre de 2010

On-line el 3 Noviembre 2010

#### Palabras clave:

Degeneración macular asociada a la edad

Endotelio corneal

Ranibizumab

Microscopía especular

Toxicidad corneal

### R E S U M E N

**Objetivo:** Evaluar el efecto de la inyección intravítrea de 0,5 mg ranibizumab sobre el endotelio corneal en pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

**Método:** Estudio piloto de serie de casos, observacional y prospectivo con observador enmascarado. Veintiséis ojos (26 pacientes) con DMAE fueron evaluados. Todos los pacientes recibieron 1 inyección intravítrea mensual de 0,5 mg de ranibizumab durante 3 meses consecutivos. El periodo de seguimiento fue de 6 meses. El endotelio corneal central fue evaluado antes, a los 7 días y a los 6 meses de la primera inyección de ranibizumab con microscopía especular. La densidad de las células endoteliales, coeficiente de variación del tamaño celular y porcentaje de hexagonalidad celular fueron analizados. También fue medido el espesor corneal central.

**Resultados:** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores preinyección y postinyección a los 7 días y 6 meses de la primera inyección de ranibizumab en las densidades de células endoteliales, coeficientes de variación del tamaño celular y porcentajes de hexagonalidad celular ( $p > 0,5$ ). Tampoco se encontraron modificaciones significativas en el espesor corneal central a lo largo del periodo de seguimiento ( $p > 0,5$ ).

**Conclusiones:** Inyecciones intravítreas repetidas de 0,5 mg ranibizumab no parecen causar cambios importantes sobre el endotelio corneal a los 6 meses de seguimiento.

© 2010 Sociedad Española de Oftalmología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Morphometric analysis of corneal endothelium after intravitreal ranibizumab (Lucentis®) in age-related macular degeneration treatment

### A B S T R A C T

**Purpose:** To determine the effect of intravitreal injection of 0.5 mg ranibizumab on the corneal endothelium in patients with age-related macular degeneration (AMD).

**Methods:** Observational, prospective case series pilot study. Twenty-six eyes of 26 consecutive patients with AMD were evaluated. All participants received one monthly intravitreal injections of 0.5 mg ranibizumab for three consecutive months. The follow-up period was 6 months. Central corneal specular microscopy was performed before injection and at 7 days

#### Keywords:

Age-related macular degeneration

Corneal endothelium

Ranibizumab

Specular microscopy

Corneal toxicity

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cinta.perezrico@gmail.com (C. Pérez-Rico).

and 6 months after the first intravitreal injection. The endothelial cell density, coefficient of variation of cell size, and percentage of hexagonal cells were analyzed and the central corneal thickness was measured.

**Results:** There were no significant differences in the endothelial cell densities, coefficients of variation of cell size and percentages of hexagonal cells before injection and at 7 days and 6 months after the first intravitreal ranibizumab injection ( $P > 0.5$ ). There was also no significant difference in central corneal thickness measurements through the follow-up period ( $P > 0.5$ ).

**Conclusions:** Repeated intravitreal injections of 0.5 mg ranibizumab do not seem to cause substantial changes in the corneal endothelium.

© 2010 Sociedad Española de Oftalmología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La inhibición del factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A) es una estrategia efectiva para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE)<sup>1-3</sup>. Ranibizumab (rhuFabV2, Lucentis; Genentech, San Francisco, CA, USA) es un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que neutraliza todas las formas biológicamente activas de VEGF, incluyendo VEGF110, VEGF121, y VEGF165, previniendo la interacción de VEGF-A con sus receptores VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR)<sup>4,5</sup>. Las inyecciones intravítreas de ranibizumab han demostrado ser de gran eficacia en el tratamiento de la neovascularización coroidea secundaria a DMAE<sup>2,3</sup>.

Varios estudios inmunohistoquímicos<sup>6-9</sup> han revelado la expresión de VEGF y de sus receptores en el endotelio de la córnea. Aunque, el perfil farmacocinético de ranibizumab intravítreo en el hombre no está totalmente determinado, en modelos animales<sup>10,11</sup> se ha detectado ranibizumab en el humor acuoso tras inyecciones intravítreas estándar. Por lo tanto, parece razonable considerar si ranibizumab puede ser potencialmente citotóxico para el endotelio de la córnea. El análisis morfométrico del endotelio obtenido con microscopía especular es un indicador sensible de la función endotelial<sup>12,13</sup>. Así, en este estudio nos proponemos analizar mediante microscopía especular la posible toxicidad inducida por ranibizumab intravítreo sobre el endotelio de la córnea en el tratamiento de la DMAE.

## Material y métodos

Veintiséis ojos de 26 pacientes con DMAE fueron incluidos en este estudio piloto de serie de casos, observacional y prospectivo. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Príncipe de Asturias y el consentimiento informado fue firmado por todos los pacientes. Los criterios de inclusión fueron: a) signos clínicos y angiográficos de membrana neovascular coroidea subfoveolar con mejor agudeza visual corregida (MAVC) de 20/100 o menor, b) no indicación de fotocoagulación con láser o terapia fotodinámica, c) edad  $\geq 50$  años, d) no historia de uso de lentes de contacto, y e) no enfermedades oculares o/y sistémicas, tales como diabetes, enfermedades del colágeno que podrían alterar la morfología del endotelio de la córnea. Todos los pacientes recibieron 1 inyección intravítreo mensual durante 3 meses

consecutivos de 0,05 ml, 0,5 mg de ranibizumab de acuerdo con el protocolo de estudio. En la exploración inicial y en las exploraciones anteriores a la administración de cada una de las inyecciones mensuales de ranibizumab se realizaron: medida de la MAVC, biomicroscopía, tonometría por aplanación, oftalmoscopia indirecta y tomografía de coherencia óptica (OCT Stratus 3000, Carl Zeiss Meditec Inc). El efecto del tratamiento fue monitorizado en base a la mejoría de la MAVC y a las mediciones de la OCT.

## Análisis de las células endoteliales

Se realizó microscopía especular de no-contacto en la córnea central con un microscopio especular Topcon SP-3000P (Topcon, Corp, Tokyo, Japan). Antes de la inyección y a los 7 días y a los 6 meses de la primera inyección de ranibizumab, un observador enmascarado (JBH) tomó tres imágenes de la córnea central, y sólo la más nítida y enfocada se archivó para análisis. El microscopio especular evaluó automáticamente la densidad de las células endoteliales, el coeficiente de variación del tamaño celular (una medida objetiva de polimegatismo), y el porcentaje de hexagonalidad celular (índice de pleomorfismo). Además, también mide automáticamente el espesor corneal. El mismo observador enmascarado realizó un análisis manual de las células endoteliales. Al menos, 75 células de bordes bien definidos fueron manualmente contadas en un cuadrado definido de la fotografía, el cual se corresponde con 0,03 mm<sup>2</sup> de la córnea real.

## Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como valores de medias y desviación estándar (DE). Las diferencias entre los datos pre- y postinyección fueron estadísticamente evaluados mediante el test de la varianza y valores de P inferiores a 0,01 fueron considerados significativos; para corregir los efectos de comparaciones múltiples se usó el test de Tukey. El análisis estadístico fue realizado mediante el programa GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software (San Diego, CA).

## Resultados

El grupo de estudio incluía 12 (46,16%) hombres y 14 (53,84%) mujeres. La edad media de estos pacientes fue de 68,26 DE

**Tabla 1 – Análisis morfométrico del endotelio de la córnea antes y después de la inyección intravítrea de 0,5 mg de ranibizumab (Lucentis®) en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad**

N = 26	Media y DE (rango)		
	Preinyección	7 días postinyección	6 meses postinyección
Densidad de células endoteliales (cels/mm <sup>2</sup> )	2.339,73 DE 367,08 (1.020 a 2.862)	2.322,88 DE 366,83 (1030 a 2844)	2.298,42 DE 387,60 (1001 a 2840)
Coefficiente de variación del tamaño celular	35,19 DE 6,35 (27 a 49)	36,50 DE 7,66 (23 a 55)	37,53 DE 8,33 (28 a 55)
% Hexagonalidad	51,15 DE 7,30 (32 a 60)	51,57 DE 7,74 (38 a 66)	49,84 DE 8,82 (32 a 67)
Espesor corneal (μm)	0,501 DE 0,038 (0,411 a 0,577)	0,494 DE 0,040 (0,402 a 0,571)	0,507 DE 0,044 (0,411 a 0,571)

DMAE: degeneración macular asociada a la edad.

5,03 años (rango: 62 a 80 años). Quince ojos (57,69%) fueron fágucos y 11 ojos (42,31%) pseudoafágucos. Todos los pacientes completaron el periodo de 6 meses de seguimiento. No se registraron efectos adversos al tratamiento.

### Densidad de células endoteliales y morfología

Todas las mediciones se realizaron antes de la inyección y a los 7 días y a los 6 meses de la primera inyección intravítrea de ranibizumab. La media de las densidades de células endoteliales preinyección y a los 7 días y 6 meses postinyección fueron 2.339,73 DE 367,08 cél./mm<sup>2</sup> (rango: 1.020 a 2.862), 2.322,88 DE 366,83 cél./mm<sup>2</sup> (rango: 1.030 a 2.844) y 2.298,42 DE 387,60 cél./mm<sup>2</sup> (rango: 1.001 a 2.840) respectivamente (tabla 1). Las medias de los coeficientes de variación preinyección y a los 7 días y 6 meses postinyección fueron 35,19 DE 6,35 (rango: 27 a 49), 36,50 DE 7,66 (rango: 23 a 55) y 37,53 DE 8,33 (rango: 28 a 55) respectivamente (tabla 1). Las medias de los porcentajes de hexagonalidad celular preinyección y a los 7 días y 6 meses postinyección fueron 51,15 DE 7,30 (rango: 32 a 60), 51,57 DE 7,74 (rango: 38 a 66) y 49,84 DE 8,82 (rango: 32 a 67) respectivamente (tabla 1). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguna de las variables en los diferentes tiempos analizados ( $p > 0,5$ ).

Respecto al efecto de ranibizumab intravítreo sobre el espesor corneal no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las medidas preinyección (0,501 DE 0,038 μm) y postinyección a los 7 días (0,494 DE 0,040 μm) y a los 6 meses (0,507 DE 0,044 μm) ( $p > 0,5$ ) (tabla 1).

### Discusión

En este estudio se ha demostrado que la inyección intravítrea de 0,5 mg de ranibizumab en pacientes con DMAE no produce efectos tóxicos a nivel del endotelio corneal. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los valores pre- y postinyección en los tiempos estudiados (7 días y 6 meses), en el espesor corneal ni en ninguno de los parámetros morfométricos endoteliales analizados, tales como densidad de las células del endotelio corneal, coeficiente de variación del tamaño celular y porcentaje de hexagonalidad celular.

En nuestro conocimiento, no se ha estudiado mediante microscopía especular el efecto tóxico de ranibizumab sobre

el endotelio de la córnea en el tratamiento de la DMAE. En este sentido nuestro estudio tiene ciertas limitaciones relacionadas con el pequeño tamaño de la muestra (N=26) y el amplio rango de la densidad preoperatoria de las células endoteliales. Por lo tanto, en este estudio piloto para alcanzar la significación estadística para una potencia de estudio del 80% y asumiendo un error alfa del 5%, se requerirán unos 50-60 pacientes siempre que las diferencias encontradas entre los valores pre- y postinyección respecto a la densidad de las células endoteliales de la córnea se mantuvieran con la misma tendencia.

En conclusión, podemos decir que inyecciones intravítreas repetidas de 0,5 mg de ranibizumab para tratamiento de la neovascularización coroidea secundaria a DMAE no tienen efectos tóxicos significativos sobre el endotelio corneal en este estudio a los 6 meses de seguimiento.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham Jr ET, Feinsod M, Guyer DR, VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2004;351:2805-16.
2. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006;355:1419-31.
3. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, et al. Ranibizumab vs verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006;355:1432-44.
4. Van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA. Inhibitors of ocular neovascularization: Promises and potential problems. *JAMA.* 2005;293:1509-13.
5. Lowe J, Araujo J, Yang J, Reich M, Oldendorp A, Shiu V, et al. Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.* 2007;85:425-30.
6. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004;82:557-63.

7. Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2514-22.
8. Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea.* 2007;26:977-82.
9. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature.* 2006;443:993-7.
10. Gaudreault J, Fei D, Rusit J, Suboc P, Shiu V. Preclinical pharmacokinetics of ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:726-33.
11. Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, Pulido JS, Ezzat MK, Singh RJ. Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis). *Ophthalmology.* 2007;114:2179-82.
12. Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF, Schultz KJ. Corneal endothelial changes in type I and type II diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol.* 1984;98:401-10.
13. Geroski DH, Edelhauser HF. Morphometric analysis of the corneal endothelium. Specular microscopy vs. alizarin red staining. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30:254-9.