

Hallazgos en el electrorretinograma multifocal (ERGmf) posterior a la aplicación de bevacizumab (Avastin) intravítreo

Dra. Victoria Cubas-Lorenzo, Dra. Mitzy Torres-Soriano, Dr. José Luis Díaz-Rubio, Dra. Verónica Kon-Jara, Dr. Jans Fromow-Guerra, Dr. Hugo Quiroz-Mercado, Dr. Juan M. Jiménez-Sierra

RESUMEN

Introducción: Existen pocos trabajos en donde se reportan hallazgos electrofisiológicos posteriores a la aplicación en humanos de bevacizumab intravítreo. En este estudio el objetivo es determinar, mediante electrorretinograma multifocal (ERGmf), la seguridad y toxicidad a corto plazo de su uso.

Método: Fueron tratados con bevacizumab intravítreo (2.5 mg/0.1 cc) 31 ojos con diversa patología retiniana. Previo al tratamiento y un mes posterior a éste, a todos los pacientes se les realizó ERGmf.

La variable analizada fue la onda P1 tomando en cuenta la densidad, amplitud y el tiempo implícito de respuesta. Se compararon los registros del estudio basal y de 1 mes posterior al tratamiento.

Resultados: Los cambios observados en la respuesta electrofisiológica no fueron estadísticamente significativos encontrando una $p > 0.05$ en todas las variables analizadas.

Discusión: Se ha difundido el uso de bevacizumab sin evidencia clínica de seguridad. Existe evidencia de daño a células ganglionares y al epitelio pigmentario de la retina, la cual no es medible con ERGmf.

Conclusiones: Los resultados sugieren que no hay cambios significativos a corto plazo en la respuesta electrofisiológica de la retina con el uso de bevacizumab intravítreo. Sin embargo, no es posible determinar la presencia de toxicidad retiniana mediante este estudio.

Palabras clave: Bevacizumab, toxicidad, electrorretinograma multifocal (ERGmf).

SUMMARY

Introduction: There are few papers regarding electrophysiological findings after intravitreal application of bevacizumab. We sought to determine the safety and toxicity in a short term follow-up as determined by multifocal electroretinogram (mfERG).

Methods: 31 eyes with diverse retinal pathology treated with intravitreal bevacizumab (2.5 mg/0.1 cc) underwent baseline and one month follow-up mfERG.

The P1 wave response was analyzed measuring density, amplitude and implicit time.

Results: The changes observed in the electrophysiologic response were not statistically significant; finding a p value > 0.05 for all variables analyzed.

Discussion: The use of intravitreal bevacizumab has become widespread without clinical evidence of its safety. There is evidence of damage to ganglion cells and to the retinal pigment epithelium which are not amenable to measurement by mfERG.

Conclusions: The results suggest there is no significant change in the retinal electrophysiological response in a short term follow-up with the use of intravitreal bevacizumab, however, it is not possible to determine retinal toxicity with this study.

Key words: Bevacizumab, toxicity, multifocal electroretinogram (mfERG).

INTRODUCCIÓN

El proceso de angiogénesis es altamente complejo y está regulado por al menos 20 factores proangiogénicos, más de 30 factores antiangiogénicos, y diversos tipos celulares (1). En 1989 Ferrara y Plouet identificaron al factor de creci-

miento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor -VEGF-*) como uno de los estimulantes más potentes para el crecimiento de los vasos sanguíneos; éste fue previamente aislado por Dvorak en 1983 y conocido como el factor de permeabilidad vascular.

Durante el desarrollo de la retina ocurre un proceso de neovascularización fisiológica en el cual nuevos vasos crecen del disco óptico hacia la periferia avascular de la retina; en la neovascularización patológica los nuevos vasos crecen hacia la cavidad vítrea (2).

El gen que codifica el VEGF se encuentra en el cromosoma 6p21.3. Existen 6 isoformas diferentes, VEGF^{110, 121, 144, 165, 189 y 206}. Se ha demostrado que se encuentra involucrado en el desarrollo vascular normal, la ovulación y la angiogénesis, y que uno de los principales reguladores de su expresión es la hipoxia (1).

Existen múltiples enfermedades oculares en las cuales la angiogénesis juega un papel importante y se ha implicado al VEGF en su fisiopatología. Su antagonismo terapéutico ha resultado en inhibición de la neovascularización a nivel retiniano y coroideo, así como en reducción de la permeabilidad vascular (3).

Los agentes anti-VEGF pueden ser usados para tratar tanto la neovascularización como padecimientos con fuga vascular. Dentro de estos medicamentos se encuentran el pegaptanib (Macugen®), el ranibizumab (Lucentis®) y el bevacizumab (Avastin®), entre otros.

El bevacizumab (Genentech Inc, South San Francisco, CA) es un anticuerpo monoclonal humanizado que actúa en contra de la molécula del VEGF de forma no selectiva (3, 4). En un inicio fue usado de forma sistémica en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) en su variedad húmeda. Varios efectos adversos han sido relacionados con su uso sistémico; algunos son hipertensión arterial sistémica, epistaxis, hemorragia gastrointestinal y eventos tromboticos. Por esta razón, se ha usado de forma intravítrea en un intento por disminuir sus efectos secundarios sistémicos. Sin embargo, la presencia de toxicidad retiniana es aún una preocupación (5).

El electroretinograma multifocal (ERGmf) es un método de diagnóstico electrofisiológico relativamente nuevo. Fue introducido por primera vez por Sutter y Tran en el año de 1992.

Esta técnica permite realizar una medición topográfica de la actividad electrofisiológica del polo posterior mediante el estímulo simultáneo de diferentes regiones de la retina (6).

Este método ha sido utilizado para realizar una evaluación objetiva de la función retiniana en múltiples padecimientos, sin embargo, aún se encuentra en desarrollo para su uso clínico y no se han establecido valores normales específicos. El origen de la respuesta registrada no es un potencial eléctrico directo, sino la extracción matemática de la señal recibida (6-9).

El uso del ERGmf bajo el protocolo estándar (establecido por la International Society for Clinical Electrophysiology of Vision – ISCEV) refleja la respuesta fotópica, de los 35° centrales de la retina, a estímulos luminosos rápidamente cambiantes (6) (Figura 1).

Generalmente, en las enfermedades maculares se produce una depresión en el pico central de la onda de registro de la densidad de respuesta, la cual se encuentra también alterada en presencia de líquido subretiniano. Estudios previos

también han demostrado que las capas internas de la retina contribuyen a la respuesta del ERGmf (10, 11).

Actualmente existen pocos trabajos en los que se reportan los efectos secundarios tóxicos del bevacizumab sobre la función de la retina (5, 12, 13). En este estudio el objetivo es determinar, mediante electroretinograma multifocal (ERGmf), la seguridad y toxicidad a corto plazo de su uso; describimos los hallazgos electrofisiológicos en pacientes con diferente patología retiniana quienes fueron tratados con 2.50 mg de bevacizumab intravítrea.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio clínico prospectivo e intervencional. Los pacientes fueron reclutados en el Servicio de Retina de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México, “Hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes”.

Treinta y un ojos fueron incluidos en el estudio. Se discutieron las opciones terapéuticas con los pacientes y éstos firmaron un consentimiento informado. Posteriormente fueron tratados por diferentes patologías de retina con una inyección intravítrea de 0.1 ml de bevacizumab (2.5 mg), 4 mm

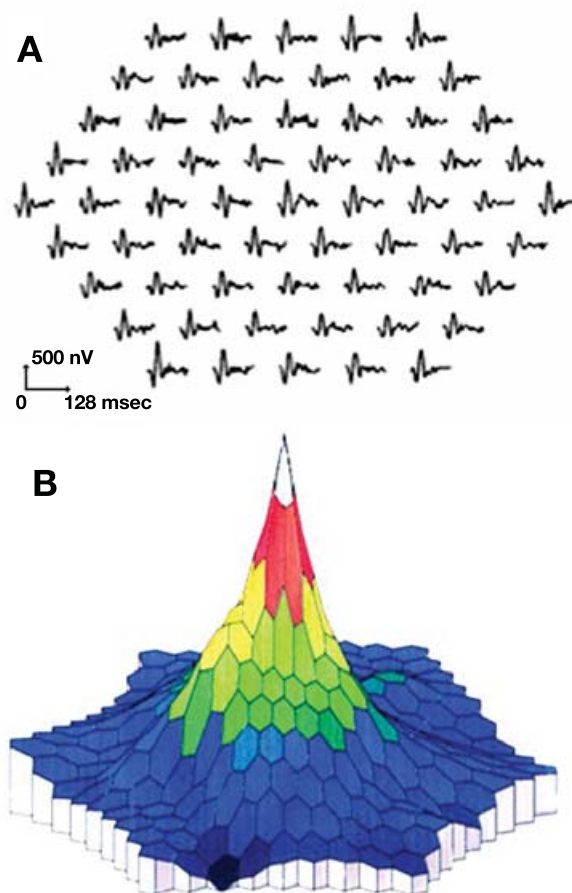


Fig. 1. A. Ejemplo de registro del ERGmf en el que se utilizó un patrón de estímulo de 61 elementos. B. Respuesta representada en imagen topográfica en 3-D de imagen A.



Fig. 2. Patrón de estímulo hexagonal representativo del ERGmf con 61 elementos.

posterior al limbo esclerocorneal en el cuadrante supero-temporal en condiciones de antisepsia.

Se les realizó ERGmf previo al tratamiento y un mes posterior a la aplicación inicial de éste.

Para realizar el ERGmf se utilizó el protocolo descrito en las "Guías para el electroretinografía multifocal clínica" de la ISCEV. Previo al estudio se indujo dilatación pupilar con gotas de tropicamida al 0.5% y fenilefrina al 0.5%; se adaptó a los pacientes a luz ambiente durante 15 minutos; el registro se llevó a cabo con electrodos corneales bipolares en lente de contacto Burien-Allen (Hansen Ophthalmic Laboratories, Iowa City, Iowa) mediante el sistema RETIsan (Roland Consult, Wiesbaden, Germany). Se utilizó un monitor con sesenta y un elementos hexagonales como estímulo con un punto de fijación central (Figura 2).

La variable analizada fue la onda P1 tomando en cuenta la densidad, amplitud y el tiempo implícito de respuesta de los 5 anillos evaluados. (Figuras 3, 4). Se compararon los registros del estudio basal y de un mes posterior al tratamiento. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el sistema SPSS v. 11.0. y la prueba no paramétrica de Mann-Whitney/Wilcoxon; una p menor a 0.05 fue considerada como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Treinta y un ojos de 31 pacientes fueron incluidos en el estudio, 12 hombres (38.7%) y 19 mujeres (61.3%). Dentro de los diferentes diagnósticos se incluyeron 13 ojos (41.9%) con neovascularización coroidea (NVC) y degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), 6 (19.4%) con edema macular diabético, 2 (6.5%) con retinopatía diabética proliferativa (RDP), 1 (3.2%) con RDP fotocoagulada, 3 (9.7%) con NVC en miopía patológica, 3 (9.7%) con NVC idiopática, 2

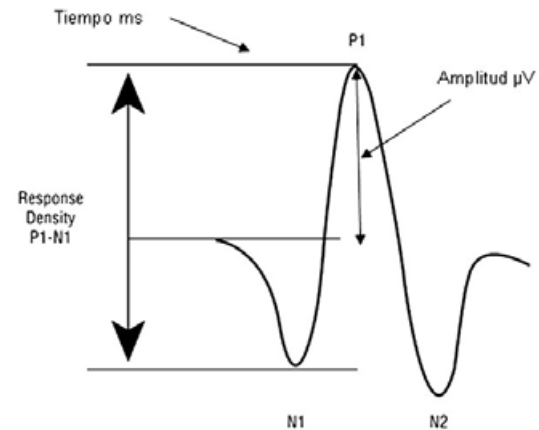


Fig. 3. Diagrama de una respuesta del ERGmf en el cual se muestran las características principales de la onda de registro P1. Densidad (nV/deg²), amplitud (µV) y tiempo implícito (ms) de respuesta.

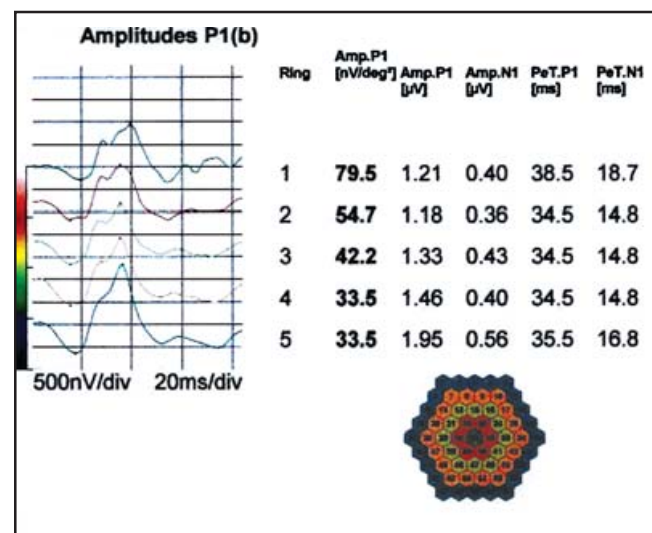


Fig. 4. Esquema de valores para cada uno de los 5 anillos evaluados correspondientes a los 35° de visión central estimulados

(6.5%) con proceso oclusivo vascular y 1 (3.1%) con telangiectasia (Cuadro 1). En cuanto al número de dosis de bevacizumab, 22 (71%) pacientes recibieron 1 dosis, 7 (22.6%) 2 dosis, y 2 pacientes (6.5%) 3 dosis. En 15 pacientes (48.4%) se inyectó el ojo derecho y en 16 (51.6%) el ojo izquierdo.

La densidad de respuesta de la onda P1 (nV/deg²) no mostró cambios estadísticamente significativos en la sumatoria de respuesta y en los anillos 1, 2, 4, 5 ($p = 0.05$). En el anillo 3 se encontró una $p = 0.048$ (Cuadro 2).

En la amplitud de respuesta de P1 (Amp P1 µV), no hubo una diferencia significativa ($p > 0.05$) en los anillos 1, 2, 4 y 5. En el anillo 3 se encontró una $p = 0.045$. (Cuadro 3).

En el tiempo implícito de respuesta de P1 (ms) se encontró una p mayor a 0.05 en los 5 anillos (Cuadro 4).

En el anillo 3 se encontró que para la densidad y amplitud de respuesta de P1 la p es estadísticamente significativa, sin embargo, este hallazgo no es clínicamente significativa.

tivo. La sumatoria de la densidad de respuesta (similar a la respuesta del electroretinograma estándar) no mostró cambios estadísticamente significativos.

Posterior al tratamiento no se encontraron efectos adversos secundarios, oculares ni sistémicos, en ninguno de los pacientes.

Cuadro 1. Patologías incluidas en el estudio y número de casos

Patología	Frecuencia	Porcentaje
NVC y DMRE	13	41.9
Edema macular diabético	6	19.4
RDP	2	6.5
RDP fotocoagulada	1	3.2
NVC en miopía patológica	3	9.7
NVC idiopática	2	9.7
Proceso oclusivo vascular	2	6.5
Telangiectasia	1	3.1
Total	31	100.0

Cuadro 2. Densidad de respuesta de P1 (nV/deg²) basal y un mes posterior al tratamiento

Anillo	Amp. P1 basal	Amp. P1 al mes de tratamiento	p
1	4.015	3.798	0.533
2	2.639	2.585	0.787
3	2.246	2.016	0.048
4	1.877	1.803	0.384
5	1.814	1.691	0.092
Sumatoria	5.455	5.132	0.139

Cuadro 3. Amplitud de respuesta de P1 (μV) basal y un mes posterior al tratamiento

Anillo	Amp. P1 basal	Amp. P1 al mes de tratamiento	p
1	0.061	0.057	0.491
2	0.056	0.055	0.788
3	0.070	0.062	0.045
4	0.081	0.078	0.360
5	0.104	0.097	0.090

Cuadro 4. Tiempo implícito de respuesta (ms) basal y un mes posterior al tratamiento

Anillo	PeT. P1 basal	PeT. P1 al mes de tratamiento	p
1	38.590	39.065	0.822
2	38.906	39.077	0.807
3	37.274	38.694	0.177
4	36.832	37.452	0.564
5	36.448	37.645	0.268
Sumatoria	37.260	37.230	0.887

DISCUSIÓN

Existen pocos trabajos en donde se reportan hallazgos electrofisiológicos posteriores a la aplicación en humanos de bevacizumab intravítreo y, a pesar de la falta de evidencia clínica, se ha difundido ampliamente su uso. Manzano y Shahar describieron la ausencia de toxicidad ocular asociada a bevacizumab intravítreo en conejos (5, 13). En el 2006 Maturi y cols. reportaron una serie de 9 pacientes con DMRE exudativa tratados con bevacizumab intravítreo, en 4 de ellos se realizó ERGmf previo y posterior al tratamiento y en 5 ERG estándar (ERGst); encontraron una mejoría en la respuesta macular del ERGmf posterior al tratamiento y sugieren que no hay toxicidad a los fotorreceptores medible en el ERGst a corto plazo (12). En el 2007 Pai y cols. reportan una serie de 21 pacientes con diferentes patologías de retina en quienes se aplicó 1.25 mg de bevacizumab intravítreo, entre otros estudios a algunos de los pacientes se les realizó ERGst previo y 12 semanas después del tratamiento; los autores reportan no haber observado deterioro de la respuesta electrofisiológica (14).

La inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos es actualmente una de las áreas de investigación con un rápido crecimiento dentro de la oftalmología.

Se ha observado que el bloqueo selectivo de la isoforma VEGF₁₆₅ resulta en inhibición de la adhesión leucocitaria y del proceso de neovascularización patológica, sin embargo, la inhibición de todas sus isoformas suprime tanto la neovascularización patológica como la fisiológica en tejidos sanos (2, 15). Dentro de los fármacos actualmente utilizados para la inhibición del VEGF encontramos el pegaptanib (Macugen®), el ranibizumab (Lucentis®) y el bevacizumab (Avastin®) entre otros aún en investigación.

El pegaptanib es un antagonista selectivo del VEGF que actúa uniéndose a la isoforma 165 y su uso está indicado en la DMRE húmeda utilizando una dosis intravítreo de 0.3 mg hasta cada 6 semanas. El ranibizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante diseñado para uso intravítreo en DMRE húmeda; su acción la ejerce mediante la unión no selectiva al VEGF y la dosis recomendada es de 0.5 mg una vez al mes (16). El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que actúa en contra de la molécula del VEGF. Su uso ha sido aprobado en Estados Unidos por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso intravenoso en combinación con 5-fluoracilo para el tratamiento del carcinoma colorrectal.

A pesar de no estar aprobado para su uso intravítreo, se ha usado en el tratamiento de diversas patologías de retina. La dosis más comúnmente usada actualmente es de 1.25 mg (0.05 ml) hasta 2.50 mg (0.1 ml) (17).

Recientemente Nishijima y cols. evaluaron al VEGF-A como un neuroprotector importante en el sistema nervioso central y mostraron, en animales adultos, que la inhibición crónica de este factor conlleva una pérdida significativa de células ganglionares de la retina. Estos hallazgos tiene implicaciones importantes tanto para patologías neurológicas como enfermedades vasculares oculares (como retinopatía

diabética y DMRE) (18). Estas alteraciones no son medibles mediante estudios de electrofisiología.

CONCLUSIONES

A nuestro conocimiento, este corto estudio constituye la serie más grande a la fecha estudiada mediante ERGmf. La respuesta electrofisiológica de los pacientes no mostró cambios clínicamente ni estadísticamente significativos en la respuesta fotópica de los 30° centrales de visión.

Nuestros datos sugieren que el uso de bevacizumab intravítreo en una dosis de 2.5 mg no parece ser tóxico a corto plazo para los fotorreceptores.

En cuanto a la valoración mediante ERGmf es importante señalar que ésta es una técnica rápida y no invasiva que ofrece el beneficio de evaluar únicamente cambios en relación a mejoría o toxicidad que ocurran en el área central de la retina, sin embargo, no podemos valorar una respuesta generalizada de la retina.

No es posible determinar la presencia de toxicidad retiniana mediante este estudio, sin embargo, los resultados sugieren que no hay cambios significativos en la respuesta electrofisiológica de la retina a corto plazo con el uso de bevacizumab intravítreo.

Este estudio mostró varias limitaciones en las que se incluyen una muestra pequeña, un seguimiento corto y las propias del ERGmf como son la aún falta de datos de normalidad de respuesta de este método diagnóstico. Será importante realizar estudios a largo plazo y con muestras mayores para obtener nuevas conclusiones.

REFERENCIAS

1. Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:795-803.
2. Tombran-Tink J, Barnstable C. *Ocular Angiogenesis*. Humana Press. Totowa, New Jersey 2006.
3. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED y cols. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10457-10461.
4. Qaum T, Xu Q, Joussen AM, et al. VEGF-initiated blood retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2408-2413.
5. Shahar J, Avery RL, Heilweil G y cols. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina* 2006; 26:262-269.
6. Hood D, Bach M y cols. ISCEV Guidelines for clinical multifocal electroretinography (2007 edition). ISCEV: www.iscev.org.
7. Fortune B, Schneck ME, Adams AJ. Multifocal electroretinogram delays reveal local retinal dysfunction in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2638-2651.
8. Kretschmann U, Bock M, Gockeln R, Zrenner E. Clinical applications of multifocal electroretinography. *Doc Ophthalmol* 2000; 100:99-113.
9. Palmowski AM, Sutter EE, Bearse MA Jr, Fung W. Mapping of retinal function in diabetic retinopathy using the multifocal electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:2586-2596.
10. Hood DC, Greenstein V, Frishman L y cols. Identifying inner retinal contributions to the human multifocal ERG. *Vision Res* 1999; 39:2285-2291.
11. Hood DC, Frishman LJ, Saszik S, Viswanathan S. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:1673-1685.
12. Maturi RK, Bleau LA, Wilson DL y cols. Electrophysiologic findings after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006; 26(3):270-274.
13. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina* 2006; 26:257-261.
14. Pai SA, Setty R, Vijayan PB y cols. Clinical, anatomic, and electrophysiologic evaluation following intravitreal bevacizumab for macular edema in retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 2007; 143(4):601-606.
15. Heiduschka P, Julien S, Hofmeister S y col. Bevacizumab (Avastin) does not harm retinal function after intravitreal injection as shown by electroretinography in adult mice. *Retina* 2008; 28(1):46-55.
16. Food and Drug Administration (FDA). www.fda.gov.
17. Bakri S, Snyder M y cols. Six-Month stability of bevacizumab (Avastin) binding to vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing. *Retina* 2006; 26:519-522.
18. Nishijima K, Ng YS, Zhong L y cols. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol*. 2007; 171(1):53-67.