



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

TESIS DE MAESTRÍA

**Niveles séricos del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial en pacientes con retinopatía del prematuro tipo 1 tratados con Bevacizumab y Ranibizumab.
ECCA. NCT03148132**

Ada Gabriela Hernández Gámez

DIRECTOR DE TESIS
M. en C. Martha Giselda Rangel Charqueño

CO – ASESORES
M. en C. Mauricio Pierdant Pérez
M. en C. Francisco Jesús Escalante Padrón
D. en C. Leticia Yañez Estrada
D. en C. Silvia Romano Moreno
M. en C. Marco Ulises Martínez Martínez

mes y año

DIRECTOR DE TESIS	
M. en C. Martha Giselda Rangel Charqueño	
ASESORES	
M. en C. Mauricio Pierdant Pérez	
M. en C. Francisco Jesús Escalante Padrón	
D. en C. Leticia Yañez Estrada	
M. en C. Marco Ulises Martínez Martínez	
D. en C. Silvia Romano Romero	
SINODALES	
M. en C. Jorge Alberto Mujica Guevara	
M. en C. Mario Aurelio Martínez Jiménez	
Dra. Ana Ruth Mejía Elizondo	
D. en C. Mariana Salgado Bustamante	
<p>M. en C. Ma. Del Pilar Fonseca Leal Jefe de Investigación y Posgrado Clínico, Facultad de Medicina UASLP</p>	<p>D. en C. Antonio Augusto Gordillo Moscoso Coordinador de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica</p>

RESUMEN

Objetivos: Comparar los niveles séricos del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) posterior a la aplicación intravítrea de bevacizumab (0.05mg/0.02mL) o ranibizumab (0.025 mg/0.025mL) como tratamiento de la Retinopatía del prematuro tipo 1

Sujetos y métodos: Estudio clínico controlado aleatorizado. Pacientes con retinopatía del prematuro tipo 1 a quien se haya aplicado bevacizumab o ranibizumab, se obtuvieron muestras de sangre antes, a las 24 h, 2 y 8 semanas posteriores a la aplicación. Se analizaron mediante ELISA. Se realizó un análisis de ANOVA de medidas repetidas. Se incluyeron sujetos con antecedente de prematuridad sin retinopatía del prematuro a quienes se les realizó también una medición del VEGF.

Resultados: Se incluyeron 16 pacientes, 9 (56.2%) fueron tratados con bevacizumab, de los 16 pacientes, 10 (62.5%) son del sexo masculino. La edad media al diagnóstico fue de 48.6 días (± 14.8 días), el peso al nacer de 1272.5 gr (± 354.12 gr), y las semanas de gestación al nacer de 30.4 semanas (± 2.67 semanas). Se observó una diferencia estadísticamente significativa de los niveles séricos de VEGF entre ambos grupos según el ANOVA de medidas repetidas ($p=0.03$), no así en el análisis posthoc. En un análisis comparativo entre los 2 grupos por cada tiempo de muestreo, se observa que los pacientes tratados con el bevacizumab tuvieron niveles menores que los pacientes tratados con ranibizumab en la semana 2 posterior al tratamiento ($p=0.001$). De los 15 pacientes del grupo control, las características observadas fueron 11 (73.3%) del sexo masculino, el peso al nacer promedio fue de 1610g (± 302.72), la edad al nacer promedio de 34 (± 1.5) semanas de gestación, la edad promedio al momento de la toma de la muestra 42(± 25.5) días de vida y la concentración del VEGF de 61(± 137.25) pg/mL. Dentro de este grupo se realizó una correlación entre las concentraciones y la edad con un resultado de 35% ($p= 0.19$).

Conclusiones:

El VEGF disminuyó en ambos grupos de tratamiento así como en el grupo control, por lo que pudiera no ser completamente atribuible a la administración de antiangiogénicos.

Los tratamientos empleados en este estudio dieron resultados positivos en regresión de la ROP. No encontramos complicaciones atribuibles al empleo de los fármacos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ÍNDICE	2
INDICE DE CUADROS.....	4
INDICE DE TABLAS.....	4
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	6
AGRADECIMIENTOS.....	7
DEDICATORIA	8
1. ANTECEDENTES	9
1.1 FISIOPATOLOGÍA	9
1.2 FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF).....	10
1.3 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO	13
1.4 CRITERIOS DE TRATAMIENTO	15
1.5 TRATAMIENTO	15
1.6 ANTIANGIOGÉNICOS	16
1.7 BEVACIZUMAB (BVZ)	17
1.8 RANIBIZUMAB (RNB).....	17
1.9 DOSIS DE ANTIANGIOGÉNICOS PARA PACIENTES PREMATUROS.....	17
1.10 NIVELES SISTÉMICOS DE VEGF POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE ANTIANGIOGÉNICOS	18
1.11 SEGURIDAD.....	19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
OBJETIVOS SECUNDARIOS	23
5. SUJETOS Y MÉTODOS	24

DISEÑO DEL ESTUDIO.....	24
LUGAR DE REALIZACIÓN Y UNIVERSO	24
CRITERIOS DE SELECCIÓN:	24
TIPO DE MUESTREO.....	24
VARIABLES DE ESTUDIO	25
PLAN DE TRABAJO	26
RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES	28
FINANCIAMIENTO	28
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	29
7. ASPECTOS ÉTICOS	30
8. RESULTADOS.....	30
Comparación de los niveles séricos de VEGF.....	32
Niveles séricos de VEGF por grupos.....	34
Grupo control	39
Seguridad.....	41
9. DISCUSIÓN	42
10. LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS	46
11. CONCLUSIONES.....	46
12. BIBLIOGRAFÍA.....	47
13. ANEXOS.....	51
ANEXO I ESTUDIOS DE BEVACIZUMAB COMO TRATAMIENTO PARA ROP	51
ANEXO II PROTOCOLO PARA LA APLICACIÓN DE MEDICAMENTOS INTRAVÍTREOS.....	51
ANEXO III TÉCNICA DE ELISA.....	52
ANEXO IV CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	53
ANEXO V ESTUDIOS DE SEGURIDAD DE ANTIANGIOGÉNICOS EN ADULTOS CON DIAGNÓSTICO DE DMRE.	54
ANEXO VI CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	55
ANEXO VII AVISO DE PRIVACIDAD	58
ANEXO VIII TABLA DE ALEATORIZACIÓN POR GRUPOS	60
ANEXO IX CARTA DE AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL CENTRAL IGNACIO MORONES PRIETO ..	61
ANEXO X: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	10

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1 PROCESOS FISIOLÓGICOS EN LOS QUE PARTICIPA EL VEGF.....	11
CUADRO 2 ESTUDIOS SOBRE CONCENTRACIONES SISTÉMICAS DE VEGF EN PACIENTES CON Y SIN ROP	12
CUADRO 3 CLASIFICACIÓN DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO	14
CUADRO 4 CLASIFICACIÓN DE LA ROP SEGÚN EL ET- ROP	15
CUADRO 5 CARACTERÍSTICAS DE BEVACIZUMAB Y RANIBIZUMAB.	16
CUADRO 6 ESTUDIOS DE EVENTOS ADVERSOS SISTÉMICOS EN PACIENTES PREMATUROS TRATADOS CON BEVACIZUMAB-LÁSER.....	20
CUADRO 7 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES	25
CUADRO 8 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	53
CUADRO 9 ESTUDIOS DE SEGURIDAD DE ANTIANGIOGÉNICOS EN PACIENTES ADULTOS	54

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES POR GRUPO.	31
TABLA 2 CONCENTRACIONES SÉRICAS DEL VEGF DEL GRUPO DE BEVACIZUMAB..	31
TABLA 3 CONCENTRACIONES SÉRICAS DE VEGF DEL GRUPO DE RANIBIZUMAB.....	32
TABLA 4 DATOS DEMOGRÁFICOS GRUPO CONTROL	39

INDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1 FISIOPATOLOGÍA DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO	10
ILUSTRACIÓN 2 EXTENSIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA ROP	13
ILUSTRACIÓN 3 ESQUEMA DE LA TÉCNICA ELISA SANDWICH.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- ROP: Retinopatía del prematuro (por sus siglas en inglés “Retinopathy Of Prematurity”)
- SDG: Semanas de Gestación
- O₂: Oxígeno
- DR: Desprendimiento de retina
- VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial (Por sus siglas en inglés “Vascular Endothelial Growth Factor”).
- DMRE: Degeneración Macular Relacionada con la Edad.
- RD: Retinopatía diabética
- FDA: Por sus siglas en inglés “Food and Drug Administration”
- OFF-LABEL: Fuera de etiqueta, término empleado para el uso de medicamentos para una indicación que no ha sido aprobada por la FDA, pero es reconocida por algún grupo de autoridad en la materia.
- ET-ROP: Estudio multicéntrico del Grupo Cooperativo para el tratamiento temprano de la ROP
- BEAT-ROP: Estudio Sobre la Eficacia de Bevacizumab para el tratamiento del Estadio 3 de ROP.
- Ac: Anticuerpo
- BVZ: Bevacizumab.
- RNB: Ranibizumab.
- EPR: Epitelio pigmentado de la retina.
- ELISA: Por sus siglas en inglés “Enzyme linked ImmunoSorbent Assay”.
- C0: Concentración de VEGF obtenida previo a la aplicación del tratamiento
- C1: Concentración de VEGF a las 24 h del tratamiento.
- C2: Concentración de VEGF a las 2 semanas del tratamiento.
- C3: Concentración de VEGF a las 8 semanas del tratamiento.
- DE: Desviación estándar.
- RIQ: Rangos intercuartílicos.
- <LD: Menor al límite de detección.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento por el apoyo, paciencia y orientación de todos los docentes de la maestría, en especial a mi directora de Tesis la M. En C. Martha Rangel Charqueño, cuya idea me permitió llevar a cabo, por su guía y su tiempo dedicado a este trabajo incluyendo los momentos en los que no pude estar presente y ella tomó las riendas del estudio.

A la Dra Leticia Yañez y su equipo de trabajo, en especial a Rebeca Mejía que nos apoyó en la recepción y procesamiento de las muestras

A mis asesores Mauricio Pierdant, Marco Martínez, Francisco Escalante y Silvia Romano por todos sus comentarios y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

A mi esposo y familia por el apoyo incondicional hacia mi, por no dejar que desistiera, por apoyarme y animarme a seguir adelante.

DEDICATORIA

A mi familia por su gran apoyo.

A mi esposo por su amor y paciencia.

Todo para ustedes.

1. ANTECEDENTES.

La Retinopatía del prematuro (ROP), “es la interrupción del desarrollo neuronal y vascular normal de la retina en el niño prematuro, que, debido a mecanismos compensatorios patológicos, resulta en una aberrante vascularización de la retina.” ⁽¹⁾

Según la OMS, la ROP es responsable del 25% de los casos de ceguera infantil a nivel mundial. Su incidencia aumenta a menor edad gestacional. A nivel mundial se reporta una incidencia del 12% al 70%, en Latinoamérica del 6-82% y en México de 10.6 % a 45.8%. ⁽¹⁻³⁾

En el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” se han realizado 10 242 revisiones de pacientes con antecedente de prematurez de septiembre del 2010 a junio 2017, de los cuales 891 (8.6%) pacientes presentaron ROP, a 262 pacientes se les aplicó bevacizumab y 7 pacientes se les aplicó láser.

Los factores de riesgo conocidos para el desarrollo de la enfermedad son: uso de peso y semanas de gestación al nacer, oxígeno suplementario, transfusiones sanguíneas, aplicación de eritropoyetina, sepsis, persistencia del conducto arterioso, hipercapnia, hiperglucemia, uso de surfactante, sexo masculino y la raza caucásica. ⁽¹⁾

1.1 FISIOPATOLOGÍA

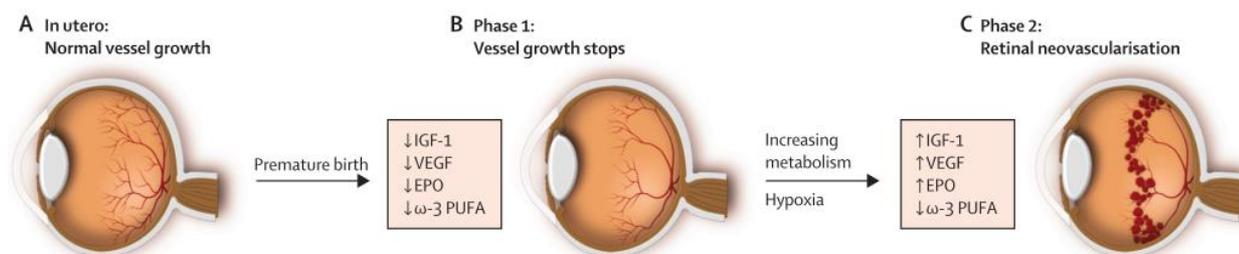
La retina inicia su desarrollo vascular después de la semana 16 de gestación, partiendo del nervio óptico y hacia la periferia. El proceso se completa a las 36 semanas de gestación en el sector nasal y a las 39 en el sector temporal. ⁽⁴⁾

El desarrollo vascular retiniano, se altera por el nacimiento prematuro.

Se presentan varios fenómenos en 2 fases. La fase 1 inicia con el nacimiento prematuro del paciente, que al ser expuesto a un cambio en la concentración de oxígeno, desencadena inhibición de los factores de crecimiento locales con interrupción en el desarrollo vascular. ^(4,5)

En la fase 2 la retina *avascular* está en estado de hipoxia, y presenta un pico de elevación de los factores de crecimiento previamente inhibidos, generando así como respuesta la aparición de neovascularización periférica. (4,5)

Ilustración 1 Fisiopatología de la Retinopatía del Prematuro (4,5)



Uno de los factores de crecimiento que se ha encontrado involucrado en la fisiopatología de la ROP es el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (*VEGF*). (5)

1.2 FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

Es una glucoproteína encargada de la regulación de la angiogénesis tanto normal como patológica. La isoforma VEGF-A165 es la principal involucrada en los procesos de angiogénesis. (6,7)

Este factor se produce en las células endoteliales en forma fisiológica, en respuesta a condiciones como: hipoxia, inflamación, y en áreas donde se presenta crecimiento celular. En el ojo se produce en las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR), células ganglionares, células de Müller y células endoteliales. (8-10)

El papel del VEGF es crucial en diferentes tejidos, sobretodo en el periodo neonatal, donde es fundamental en la glomerulogénesis, osteogénesis, tiene un papel importante en la adecuada alveolización pulmonar y producción de surfactante, así como en el neurodesarrollo. (Cuadro 1) (11)

Cuadro 1 Procesos fisiológicos en los que participa el VEGF.

PROCESOS FISIOLÓGICOS EN LOS QUE PARTICIPA EL VEGF	
Sistema óseo	Crecimiento óseo y reparación de fracturas, regeneración musculoesquelética, cicatrización de heridas.
Sistema cardiovascular	Desarrollo cardíaco, proliferación endotelial, inducción de factores como factor activador del plasminógeno, óxido nítrico y metaloproteasas, neovascularización posterior a un infarto agudo al miocardio, vasodilatación, permeabilidad vascular
Sistema respiratorio	Maduración pulmonar, supervivencia de las células alveolares.
Aparato genito-urinario	Función reproductiva femenina, Glomerulogénesis, función renal,
Hígado-Páncreas	Supervivencia de los islotes pancreáticos, Protección de los hepatocitos del daño tóxico.
Sistema nervioso	Diferenciación y función de las células dendríticas, supervivencia de las células neuronales

Modificado de Tolentino M. Systemic and Ocular Safety of Intravitreal Anti-VEGF Therapies for Ocular Neovascular Disease. *Surv Ophthalmol*, 2011 Mar;56(2):95-113.⁽¹¹⁾

En modelos animales la manipulación genética del VEGF (inactivando parcial o completamente el gen) ocasiona mayor mortalidad, detención en el crecimiento y retraso en el desarrollo de pulmones, intestino delgado, riñón y sistema nervioso central.⁽¹²⁻¹⁷⁾

Hasta el momento, no se conoce un nivel normal del VEGF en ningún grupo de edad, sin embargo, existe el antecedente de estudios en donde se compararon las concentraciones de VEGF de pacientes prematuros.

Pieh y colaboradores determinaron las concentraciones *sistémicas* de VEGF mediante ELISA a las 32 y 36 semanas de edad postmenstrual, en pacientes con y sin ROP (Cuadro 2).⁽¹⁸⁾

De la misma manera Hellgreen y colaboradores realizaron las determinaciones durante cada semana desde la semana 23 hasta la semana 40, en pacientes sin ROP, con ROP y pacientes tratados con láser (Cuadro 2).⁽¹⁹⁾

Los resultados indican gran variabilidad, es imposible entonces, encontrar puntos de corte para definir normalidad en estos pacientes.

Cuadro 2 Estudios sobre concentraciones sistémicas de VEGF en pacientes con y sin ROP

	Sin ROP		Con ROP			
Pieh y cols⁽¹⁸⁾ 32 Semanas*	658	(49-2152)	904	(142-2349)		
	pg/mL		pg/mL			
36 Semanas*	437	(89-2367)	334	(66-1334)		
	pg/mL		pg/mL			
	Sin ROP		Con ROP		ROP + Láser	
Hellgren y cols⁽¹⁹⁾ 34 Semanas ð	1076	(537-1316)	837	(508-3092)	1768	(538-6463)
	pg/mL		pg/mL		pg/mL	
36 Semanas ð	817	(422-1390)	1266	(802-3084)	1835	(700-3574)
	pg/mL		pg/mL		pg/mL	

Resultados en Mediana y Rangos(max-min) *Kit Quantikine R&D. ð Kit Luminex xMap Bio-Rad

1.3 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO

Según la última revisión de la clasificación de la ROP en 2005, se clasifica a la enfermedad por su extensión, localización y estadio de presentación. ⁽²⁰⁾

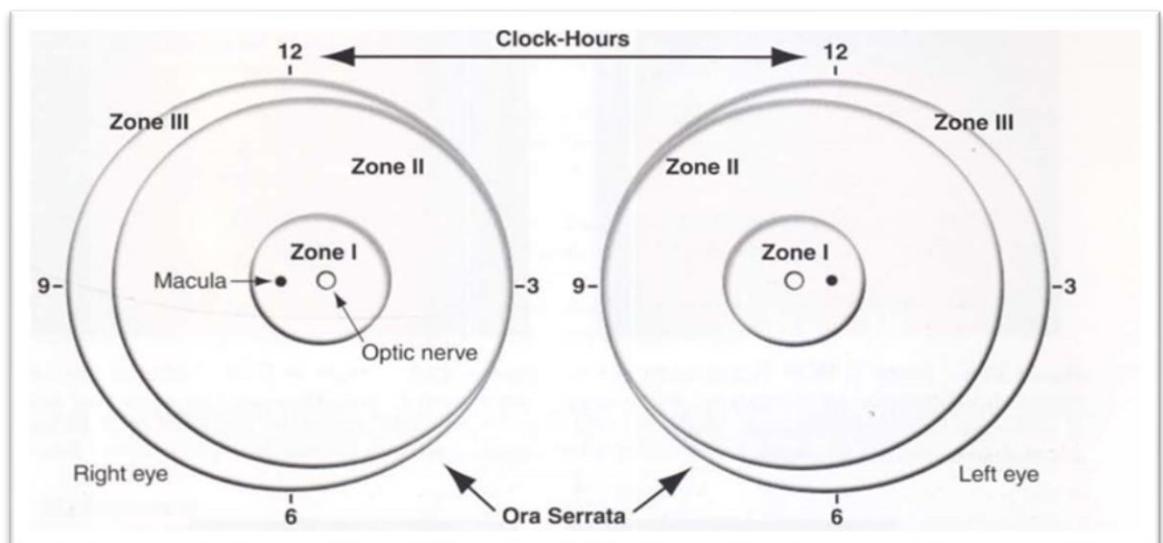
EXTENSIÓN

La extensión de la enfermedad se registra en horarios según las manecillas del reloj, lo que corresponde 1 h se consideran 30°, según los hallazgos en la exploración de fondo de ojo. ⁽²⁰⁾

LOCALIZACIÓN

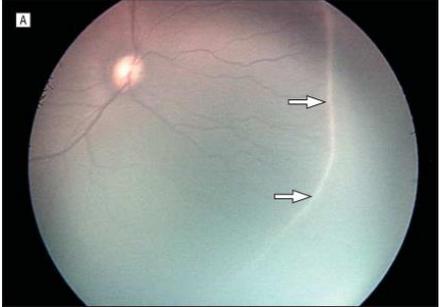
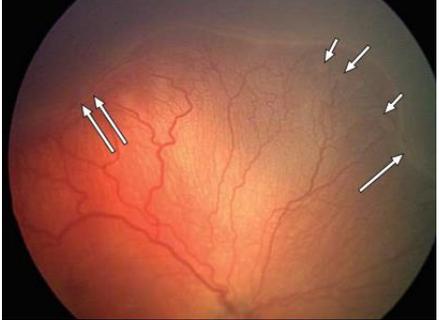
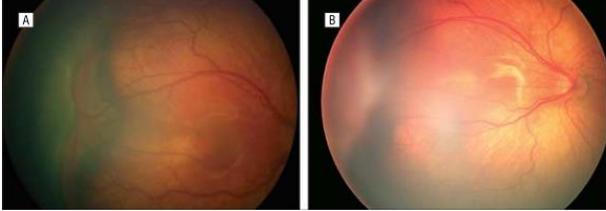
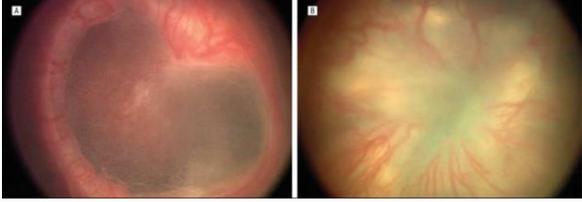
Zona 1: Circulo imaginario que mide 2 veces la distancia del nervio óptico a la mácula	Zona 2: Del limite de la zona 1 a la ora serrata nasal y el ecuador temporal	Zona 3: Retina restante en forma de media luna
---	---	---

Ilustración 2 Extensión y Localización de la ROP⁽²⁰⁾



ESTADIOS

Cuadro 3 Clasificación de la Retinopatía del prematuro (20)

ESTADIO	IMAGEN
<p>E 1: Línea blanca bien definida que separa la retina avascular y vascular</p>	
<p>E 2: Cresta, tiene altura y anchura, hay pequeños penachos de neovascularización (pop-corn)</p>	
<p>E 3: Membrana fibrovascular se extiende hacia el vítreo.</p>	
<p>E 4: DR*: a) Extramacular b) Macular</p>	
<p>E 5: DR* total. a) Abierto b) Cerrado</p>	

DR: Desprendimiento de retina.

Existen además características vasculares a considerar: si se observa dilatación venosa y tortuosidad arteriolar, en más de dos cuadrantes con o sin neovascularización en iris, poca dilatación pupilar y opacidad vítrea, a esto se le denomina: enfermedad plus. De existir solo dilatación y tortuosidad vascular en menor medida se denominará enfermedad pre-plus.

Cuando además de observar enfermedad plus vemos neovascularización plana de localización posterior, se denomina como: Enfermedad agresiva posterior (AP-ROP) y requiere tratamiento inmediato. ⁽²⁰⁾

1.4 CRITERIOS DE TRATAMIENTO

El Estudio multicéntrico del Grupo Cooperativo para el Tratamiento Temprano de la ROP(ET-ROP) clasificó a la enfermedad para determinar a qué pacientes debe de aplicarse tratamiento (Cuadro 4). ⁽²¹⁾

Cuadro 4 Clasificación de la ROP según el ET- ROP⁽²¹⁾

ROP TIPO 1	ROP TIPO 2
Cualquier estadio ROP con enfermedad plus en zona 1	E 1-2 en zona 1 sin enfermedad plus
E3 sin enfermedad plus en zona 1	E 3, en zona 2 sin enfermedad plus
E 2-3 con enfermedad plus en zona 2	

Según los lineamientos establecidos en este estudio, los pacientes con ROP tipo 1 deberán recibir tratamiento dentro de las siguientes 48-72 horas, de lo contrario la mayoría pudiera evolucionar a estadios 4-5 o a presentar alteraciones anatómicas importantes como cicatrices o dragging macular.

Los pacientes con ROP tipo 2 se mantendrán bajo vigilancia estrecha y se les aplicará tratamiento en caso de que evolucionen a ROP tipo 1. ⁽²¹⁾

1.5 TRATAMIENTO

Para los pacientes que cumplen con las características de ROP tipo 1 existen actualmente 2 opciones de tratamiento, enfocado en la disminución del VEGF:

- Fotocoagulación con láser: Es el estándar de oro, con una eficacia de 85%. Funciona mediante la destrucción de las células productoras del VEGF, provocando cambios anatómicos importantes como pliegues

retinianos, interrupción de la vascularización normal y defectos refractivos importantes a largo plazo. Su aplicación se realiza bajo anestesia general, en una sala de quirófano. ⁽²²⁾

- **Antiangiogénicos:** Ayudan a disminuir los niveles de VEGF en la cavidad vítrea, son actualmente el tratamiento de primera línea para ROP, permiten el desarrollo de la vasculatura retiniana. Este medicamento se aplica en 5 minutos, en el consultorio o en la cuna del paciente hospitalizado, bajo anestesia tópica.

1.6 ANTIANGIOGÉNICOS

Los antiangiogénicos son medicamentos biológicos que evitan la unión del VEGF a su receptor, inhibiendo su actividad biológica.

La FDA (Food and Drug Administration) aprobó por primera vez el Bevacizumab (Avastin®) en 2004, como tratamiento para el cáncer colorrectal metastásico. Posteriormente, en 2006 se aprobó el Ranibizumab (Lucentis®) para uso oftalmológico como tratamiento de la Degeneración Macular Relacionada con la Edad (DMRE). Recientemente, en 2017, se aprobó para el tratamiento de la retinopatía diabética. El uso de ambos medicamentos se encuentra ampliamente documentado, tanto en pacientes con ROP como en adultos con enfermedades proliferativas como glaucoma neovascular, oclusiones vasculares, edema macular.

Cuadro 5 Características de Bevacizumab y Ranibizumab.⁽²³⁾

	Bevacizumab (BVZ)	Ranibizumab (RNB)
Peso molecular	149 kDa	48 kDa
Concentración mínima inhibitoria	10ng/mL	11-27ng/mL
Vida media plasmática	21 días	12 hrs
Costo	\$9000 frasco (40 dosis adultos)	\$9900 <i>dosis</i>

1.7 BEVACIZUMAB (BVZ)

Es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe todas las isoformas del VEGF-A. Puede penetrar la retina, el EPR, hasta la coroides y alcanza la circulación sistémica. Es un anticuerpo completo que se une a sus receptores, el complejo antígeno-anticuerpo sigue un proceso de transporte intracelular hasta la matriz extracelular y al espacio intravascular. ^(23,24)

En oftalmología su uso está documentado, aunque se realiza “off-label”. (Ver anexo I)

En el año 2011 Mintz y colaboradores mostraron la eficacia de este fármaco como tratamiento de la ROP. En el estudio BEAT-ROP compararon el uso de bevacizumab intravítreo (0.625mg/0.025mL) vs láser, encontrando diferencias estadísticamente significativas en cuanto al riesgo de recidiva entre los 2 tratamientos (26% láser - 4% bevacizumab OR 0.17 IC 0.05-0.53 p=0.002). ⁽²⁵⁾

1.8 RANIBIZUMAB (RNB)

El ranibizumab (anticuerpo monoclonal humanizado) se desarrolló exclusivamente para uso oftalmológico.

Existe la hipótesis de que este medicamento puede atravesar la barrera hematorretiniana con más facilidad, por su bajo peso molecular. ⁽²³⁾

Su uso como tratamiento de ROP es limitado, por su alto costo(\$9900 pesos por dosis). Sin embargo, existen reportes donde se observó una efectividad equiparable al BVZ en cuanto a regresión de la neovascularización (90%), con pocos efectos secundarios oculares como hemorragia subconjuntival, hipertensión ocular y endoftalmitis. ⁽²⁶⁻³⁰⁾.

1.9 DOSIS DE ANTIANGIOGÉNICOS PARA PACIENTES PREMATUROS

En adultos las dosis convencionales de BVZ y RNB son 1.25mg/0.05 mL y 0.5mg/0.05mL, respectivamente.

En pacientes prematuros, no existe una dosis estandarizada de antiangiogénicos para el tratamiento de enfermedades oftalmológicas, sin

embargo se han realizado ajustes comparando el tamaño del ojo adulto (volumen 7.5 ml, peso de 7.5 gr) con el del recién nacido (volumen 2.8 ml y peso de 3 gr). por lo que se aplica la mitad de la concentración que se utiliza en adultos a nivel mundial (0.625mg/0.025 ml para BVZ y 0.25mg/0.025mL para RNB).⁽³¹⁾

En 2014, Rangel MG en pacientes del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, demostró la no inferioridad del uso de una dosis menor (0.5 mg/0.02 mL) de BVZ comparado con la dosis que se utiliza a nivel mundial (0.625 mg/0.025mL). Se observó que ambas tuvieron efectividad de 88% IC (75.68-95.46) para el grupo de menor dosis, 90% IC (76.88-97.27) para el grupo de la dosis convencional. Actualmente se utiliza la dosis de 0.5mg/0.02mL en este hospital y es la que se utilizó en el presente estudio. ⁽³²⁾

1.10 NIVELES SISTÉMICOS DE VEGF POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE ANTIANGIOGÉNICOS

Debido a que los antiangiogénicos intravítreos pueden atravesar la barrera hematorretiniana, existe evidencia de que posterior a la aplicación intravítrea de los antiangiogénicos, puede haber disminución del VEGF sistémico.

Sato y colaboradores en 2012, compararon los niveles de BVZ y VEGF posterior a la aplicación de láser transpupilar. Se observó que existe una correlación negativa entre las concentraciones séricas de BVZ y VEGF, así mismo, el medicamento fue detectado por lo menos durante 2 semanas posteriores a su aplicación. ⁽³³⁾

Existen otros estudios como el de Hong y Wu en 2015, quienes aplicaron BVZ (0.625mg/0.025mL) y observaron una disminución sostenida del VEGF en la circulación sistémica hasta por 7 semanas, mientras que no disminuyeron el resto de los factores de crecimiento como el TGF-B1, IGF-1. ^(34,35)

En cuanto a RNB, Hoerster y colaboradores en 2013, en el reporte de un caso, observaron una disminución del VEGF hasta 3 semanas posteriores a la aplicación del medicamento.⁽³⁶⁾

Zhou y colaboradores realizaron la determinación del VEGF antes y después de la aplicación de RNB en pacientes con ROP, observaron que hubo una disminución estadísticamente significativa del VEGF el primer día posterior a

la aplicación de RNB ($p < 0.002$) y que estos niveles volvieron a los valores basales dentro de las primeras 2 semanas. ⁽³⁷⁾

Wu en 2016 realizó un estudio cohorte prospectivo, comparativo con los 2 medicamentos, en 20 ojos con ROP. En este estudio, no se reporta un cálculo de muestra necesario, se utilizaron las dosis convencionales para ambos medicamentos (RNB 0.25mg/0.025mL-BVZ 0.625 mg/0.025mL). Se observó disminución de los niveles sistémicos de VEGF que se mantuvo hasta 8 semanas después de la aplicación en los pacientes tratados con BVZ ($p < 0.007$), mientras que este fenómeno no se observó en pacientes que recibieron RNB, sin embargo no midieron el VEGF a las 24 horas de la aplicación que es donde el RNB ha demostrado mayor disminución. ⁽³⁸⁾

Cabe destacar que en todos los estudios previamente mencionados hubo pérdida de pacientes durante el tiempo de seguimiento.

1.11 SEGURIDAD

Debido a la evidencia de la disminución de VEGF sistémico, se han realizado diversos estudios de seguridad, en su mayoría retrospectivos, en los que se evalúa el neurodesarrollo, entre otras variables. Sin encontrar relación directa entre estas alteraciones y la administración del medicamento.

Faltan estudios que demuestren la inocuidad del potencial paso del Bevacizumab a la circulación sistémica, la posible disminución del VEGF sistémico y las repercusiones en el futuro de los pacientes. (Cuadro 6)

Cuadro 6 Estudios de Eventos adversos sistémicos en pacientes prematuros tratados con Bevacizumab-Láser

AUTORES	DISEÑO	VARIABLES	RESULTADOS
Martínez-Castellanos et al (2013) ⁽³⁹⁾	Prospectivo (5 a) BVZ 13 pacientes.	Exploración oftalmológica <i>Neurodesarrollo</i> (Escala Denver III)	1 paciente con alteraciones en el desarrollo, no explicado por la aplicación del medicamento.
Araz-Ersan et al (2014) ⁽⁴⁰⁾	Cohorte Prospectivo (2 a) BVZ + Láser vs Láser (26 pacientes)	<i>Neurodesarrollo</i> (Escala Bayley III Cognitiva Motor Lenguaje)	Láser: 2 pacientes con alteracion en el neurodesarrollo. (motor) Láser+BVZ: 3 pacientes con alteracion en el neurodesarrollo. (motor) p= 0.395
Lien et al. (2016) ⁽⁴¹⁾	Retrospectivo(2a) 61 pacientes BVZ(33) Láser(12) Ambos(16)	<i>Neurodesarrollo</i> (Escala Bayley)	No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en cuanto a las alteraciones del neurodesarrollo (p=0.057)
Morin et al (2016) ⁽⁴²⁾	Retrospectivo 18 meses BVZ(27)/ láser (98) (125 pacientes)	<i>Neurodesarrollo</i> (Escala Bayley)	Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el área motora (p=0.02) y se encontró que hay 3.1 más alteraciones del neurodesarrollo en pacientes tratados con BVZ.

En el estudio de Morín y colaboradores a pesar de encontrar una mayor presencia de alteraciones motoras en los pacientes tratados con BVZ, también cuentan con el antecedente de tener una ROP más severa, así como condiciones sistémicas más graves que los tratados con láser.⁽⁴²⁾

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe diferencia entre los niveles séricos del VEGF en pacientes con retinopatía del prematuro tipo 1 tratados con bevacizumab (0.5 mg/0.02mL) vs ranibizumab (0.25mg/0.025mL) intravítreos?

2. JUSTIFICACIÓN.

La retinopatía del prematuro es una de las principales causas de ceguera en la edad infantil en el mundo. Los antiangiogénicos son el tratamiento de elección.

Existe controversia de su uso en pacientes prematuros porque se desconoce si la disminución del VEGF sistémico, ocasionada por el paso del medicamento a la circulación, posterior a la aplicación de los antiangiogénicos pudiera causar daño en los órganos en desarrollo.

Por lo tanto es importante evaluar los niveles séricos del VEGF posterior a la aplicación de una dosis menor de bevacizumab (0.5mg/0.02mL), que es el antiangiogénico más utilizado en oftalmología y comparar con ranibizumab, que tiene una vida media menor, para determinar que medicamento tiene mayor efecto en las concentraciones sistémicas del VEGF y pudiera implicar un mayor riesgo de presentar eventos adversos a largo plazo como alteraciones en el neurodesarrollo.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los niveles séricos del VEGF serán menores después de la aplicación intravítrea de bevacizumab en comparación con Ranibizumab en el tratamiento de la ROP tipo 1.

4. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Comparar los niveles séricos del VEGF después de la aplicación intravítrea de bevacizumab (0.5mg/0.02mL) o ranibizumab (0.25 mg/0.025mL) como tratamiento de la retinopatía del prematuro tipo 1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los niveles séricos de VEGF previo al tratamiento, 24 hrs, 2 semanas y 8 semanas posteriores a la aplicación intravítrea de bevacizumab.
- Evaluar los niveles séricos de VEGF previo al tratamiento, 24 hrs, 2 semanas y 8 semanas posteriores a la aplicación intravítrea de ranibizumab.
- Comparar los niveles séricos de VEGF de los 2 grupos de tratamiento.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Evaluar los niveles séricos basales de VEGF de un grupo de pacientes prematuros sin ROP.
- Comparar los niveles séricos de VEGF entre los grupos de tratamiento y el grupo control.
- Describir el tiempo de regresión de la enfermedad según el antiangiogénico aplicado.
- Describir reacciones adversas y/o complicaciones en caso de presentarse.

5. SUJETOS Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Estudio clínico controlado doble ciego.

LUGAR DE REALIZACIÓN Y UNIVERSO

Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. Servicio de Neonatología y Oftalmología.

UNIVERSO: Pacientes prematuros, que cumplan con los criterios para el diagnóstico de ROP tipo 1.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión: Pacientes prematuros que se encuentren hospitalizados o que acudan a revisión a la consulta externa, que cumplan con los criterios para el diagnóstico de ROP tipo 1 según el ET-ROP en ambos ojos, cuyos padres firmen el consentimiento informado para ser parte del estudio.

Criterios de no inclusión: Pacientes con malformaciones congénitas, pacientes con ROP tipo 1 que hayan recibido tratamiento previo (láser y/o antiangiogénicos).

Criterios de eliminación: Pacientes que no continúen el seguimiento en la consulta externa y cuenten con menos de 2 muestras de sangre.

TIPO DE MUESTREO

Muestreo no probabilístico por conveniencia

VARIABLES DE ESTUDIO**Cuadro 7 Definición operacional de variables**

		Dependiente		
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
ConcVEGF	Concentración plasmática de VEGF previa al tratamiento, 1 día, 2 y 8 semanas posteriores	0-infinito	ng/mL	Continua
		Independiente		
Antiang	Medicamento aplicado de forma intravítrea como tratamiento de la ROP tipo 1	Bevacizumab=A Ranibizumab=B	A/B	Dicotómica
		Otras variables		
Edad al diagnóstico	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento del diagnóstico ROP tipo 1	28 días-infinito	Días	Continua
Sexo	Características biológicas (fenotipo-genotipo) de cada individuo que lo distinguen en hombre o mujer	M-F	M=0 F=1	Dicotómica
Peso al nacer	Peso en gramos al momento del nacimiento	0-infinito	gr	Continua
Edad gestacional	Semanas de gestación al nacer	26-36	Semanas	Continua

PLAN DE TRABAJO

Se identificó a los pacientes que cumplieron con los criterios de ROP tipo 1 durante el tamizaje realizado después de las 4 semanas de vida extrauterina. Se explicó a los padres de los pacientes el objetivo del trabajo de investigación y el proceso a seguir, su aceptación para participar en el estudio fue mediante la firma del consentimiento informado.

A los pacientes cuyos padres no aceptaron formar parte del protocolo, se les ofreció sin restricción alguna el tratamiento terapéutico y seguimiento habitual (bevacizumab ó láser), al igual que a los padres de los pacientes que decidieron abandonarlo.

Se conformaron 2 grupos de forma aleatorizada con ayuda del programa R Studio® para la elección del medicamento intravítreo a administrar (ranibizumab-bevacizumab) y se aplicó el tratamiento de la forma convencional en ambos ojos. (ANEXO II)

Los resultados obtenidos de los grupos de tratamiento fueron contrastados con un grupo control, el cual estuvo conformado por pacientes prematuros sin retinopatía del prematuro de diferentes edades gestacionales y cronológicas. Sus padres fueron informados del procedimiento y se les solicitó su autorización de participación mediante la firma del consentimiento informado.

Dependiendo del grado de vascularización alcanzado, los pacientes fueron citados para su revisión cada semana o cada dos semanas.

Se colectaron cuatro muestras de sangre empleando una aguja de 22 G, colectando la muestra en tubos eppendorf sin anticoagulante por punción venosade 500µL c/u, unos minutos previos a la aplicación del tratamiento, a las 24 h y a las 2 y 8 semanas posteriores al mismo.

Inmediatamente después de la colecta de las muestras sanguíneas, éstas fueron trasladadas bajo condiciones controladas de temperatura al Laboratorio de Género, Salud y Ambiente de la Facultad de Medicina, en donde se centrifugaron para obtener el suero y se almacenaron a -70°C para su posterior análisis.

La cuantificación del factor VEGF se realizó mediante la técnica de ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, tipo sándwich), de acuerdo a las instrucciones del productor Novex® (ANEXO III). Dado a que no se contaba con información de la concentración esperada del factor VEGF en prematuros, fue necesario realizar pruebas de dilución antes de analizar las muestras de interés. Las muestras problema fueron procesadas por duplicado.

El día designado para el análisis, las muestras fueron descongeladas por etapas de temperatura (de -70°C a -20°C, de -20°C a 5°C y finalmente a temperatura ambiente).

Directamente en los posillos de las placas de ELISA se mezclaron, 50 µL de solución de incubación, 50 µL de la solución estándar de dilución, 100 µL del estándar (para construir la curva de calibración) o 50 µL de suero problema. Se agitaron suavemente y se incubaron durante 2 horas a temperatura del cuarto y protegidas de la luz. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron lavadas con la solución asignada para ello y se adicionaron 10 µL de una solución conjugada de biotina-VEGF, se incubaron por una hora a temperatura ambiente, protegidas de la luz y posteriormente se procedió a realizar un lavado. Se adicionaron 100 µL de HRP-estreptavidina, se agitaron suavemente y se incubaron por un periodo de 30 minutos, de igual manera protegidas de la luz y a temperatura del cuarto. Al término de este tiempo se añadieron 100 µL del cromógeno para desarrollar el color del complejo antígeno-anticuerpo, por lo que las muestras se incubaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz por 30 minutos. Y finalmente la reacción se detuvo al adicionar 10 µL de la solución asignada para ello.

En un lector de ELISA modelo CYTATION 3 de la marca BIOTEK® se midió la absorbancia a 450 nm de longitud de onda de cada una de las muestras problema, la concentración del factor VEGF se estimó por la interpolación del valor de la densidad óptica en la curva de calibración correspondiente, la cual, para fines de este trabajo de investigación abarcó los valores mencionados en el instructivo del kit. Los resultados se reportan en pg/mL.

Tanto los padres del paciente, como la analista y la investigadora principal estuvieron cegados durante todo el desarrollo del estudio.

RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES

Recursos humanos:

Se contó con el apoyo del departamento de Oftalmología y Neonatología del HCIMP y del Laboratorio de Género, Salud y Ambiente de la Facultad de Medicina de la UASLP.

Todos los datos fueron recabados y analizados por la investigadora principal.

Recursos materiales:

Computadora Macbook Air, diario de recolección de datos.

Ret cam, oftalmoscopio indirecto Keeler, Lupa de 28 dioptrías, Blefaróstato e indentador.

Ranibizumab/Bevacizumab

Kits ELISA (Novex ®)

Tubos de recolección de muestras Eppendorf, Guantes, Agujas 22G, Micropipetas.

FINANCIAMIENTO

La dosis de BVZ fue cubierta en su totalidad por el seguro popular para los pacientes del Hospital Central.

El RNB fue donado por el laboratorio farmacéutico de origen (Novartis®) al departamento de Oftalmología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” sin un fin en específico.

Los investigadores declaramos no tener conflicto de intereses para el desarrollo de este proyecto, ninguno de los investigadores tiene relación laboral con la casa comercial Novartis y ésta no se encuentra involucrada en el desarrollo del protocolo.

El Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” otorgó el financiamiento para la adquisición de los kits de ELISA para analizar las muestras de sangre.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

El tamaño de la muestra se realizó en el programa R Studio® (versión 1.1.383.) basado en la fórmula de comparación de las medias de Cohen⁽⁴³⁾,

$$d = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sigma}$$

utilizando la fórmula y tomando los datos de las medias obtenidas en el estudio de Wu y cols.⁽³⁸⁾

De este trabajo se tomaron la diferencia de los niveles a las 8 semanas donde para RNB fue de 261pg/mL con una desviación estándar de 134.6 y para BVZ una media de 76.5 pg/mL.

Por lo tanto, la diferencia obtenida fue: $d < (261-76.5) / 134.6 = 1.37$

Posteriormente con la fórmula pwr.t.test del paquete pwr, con una $\beta=20\%$ y $\alpha=5\%$ se obtuvo el tamaño mínimo requerido de 10 pacientes por grupo, en total 20 pacientes.

Para el análisis estadístico se realizaron medidas de tendencia central y dispersión de todas las variables. Se calculó la normalidad con la prueba de Shapiro Wilk. Se realizó imputación para los datos faltantes.

El análisis descriptivo de las variables estudiadas se analizaron de acuerdo con:

Para las variables categóricas: descripción de frecuencias y porcentajes

Para las variables numéricas: dependiendo de su normalidad se expresaron en promedio y desviación estándar o medianas y rangos intercuartílicos.

El análisis bivariado numérico se realizó con t de Student (distribución normal) y con Wilcoxon (no normales). El análisis categórico se realizó con Chi cuadrada, y en caso de casillas con valores menores de 5 con la prueba F exacta de Fisher. Se realizó un análisis de ANOVA factorial de medidas repetidas para evaluar los cambios en los niveles de VEGF de ambos grupos. Se utilizó la prueba de Bonferroni para el análisis Posthoc. (ver anexo X)

7. ASPECTOS ÉTICOS

Previa autorización del Comité de Académico de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica, se sometió el protocolo al Comité de Ética en Investigación Clínica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, el cuál fue aprobado el día 30 de Marzo de 2017 y se asignó el registro **31-17.(ANEXO X)**

Las maniobras diagnósticas y terapéuticas que se utilizaron se consideraron de riesgo mayor al mínimo según la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Se apegó a los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012

No se transgredieron los principios de la Declaración de Helsinki de 1964 y en su última revisión en octubre del 2013.

Se obtuvo la autorización de los padres o tutores de los pacientes al firmar la carta de consentimiento informado, donde se explicó el procedimiento y el objetivo del estudio. (anexo VI)

Se mantuvo la confidencialidad de los datos obtenidos, se otorgó el aviso de privacidad correspondiente. (anexo VII)

8. RESULTADOS

Se reclutaron 16 pacientes, de los cuales 9(56.2%) fueron tratados con bevacizumab, se incluyeron 10 (62.5%) pacientes del sexo masculino. La edad media al diagnóstico fue de 48.6 ± 14.8 días, el peso al nacer 1272.50 ± 354.12 g , y las semanas de gestación al nacer 30.4 ± 2.67 semanas.

Las medianas de los niveles sistémicos del VEGF fueron las siguientes: previo a la aplicación de tratamiento 111.0 ± 97.75 pg/mL, a las 24 horas 12.25 ± 33.00 pg/mL, a las 2 semanas 12.50 ± 53.12 pg/mL y a las 8 semanas 27.75 ± 40.83 pg/mL.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en las características demográficas de ambos grupos(ver Tabla 1).

Tabla 1 Características generales de los pacientes por grupo.

Variable	BVZ(n=9)	RNB(n=7)	p
Sexo (M/F)	4 (44.4%)/5(55.6%)	6(85.7%)/1(14.3%)	0.14 ¶
Edad al diagnóstico (días)	49.56 ±11.4	47.57 ±19.4	0.81§
Peso al diagnóstico (g)	2233 ±545.96	2183 ±340.8	0.82 §
Semanas de gestación al nacer (semanas)	30.28 ±3.17	30.59 ±2.0	0.82 §
Peso al nacer (g)	1313 ±409.3	1220±290.6	0.60 §

Datos expresados en medias y DE, § T de student, ¶ Prueba exacta de Fisher

Enseguida se muestran las concentraciones de cada paciente en los 4 tiempos de muestreo, por grupo de tratamiento. Existen datos faltantes y en algunos casos el resultado se encuentra debajo del límite de detección (<LD), por lo tanto para el análisis de esas muestras se utilizó el valor 0.16.

Las muestras faltantes fueron menos de 20% del total, por lo que se realizó imputación de los datos.

Tabla 2 Concentraciones séricas del VEGF del grupo de Bevacizumab.

PAC	C0	C1	C2	C3	Tratamiento de rescate
1	19.50	<LD	5.00	<LD	+
4	17.50	2.00	6.00	1.50	
6	240.50	32.50	6.50	16.00	
8	131.00	20.00	4.00	13.00	
9	54.00	6.00	12.50	NA	+
11	170.00	10.50	NA	NA	
14	14.00	<LD	<LD	27.50	
15	24.00	87.00	47.00	119.50	
16	53.50	5.50	<LD	NA	

<LD: menor al límite de detección, NA: No acudió

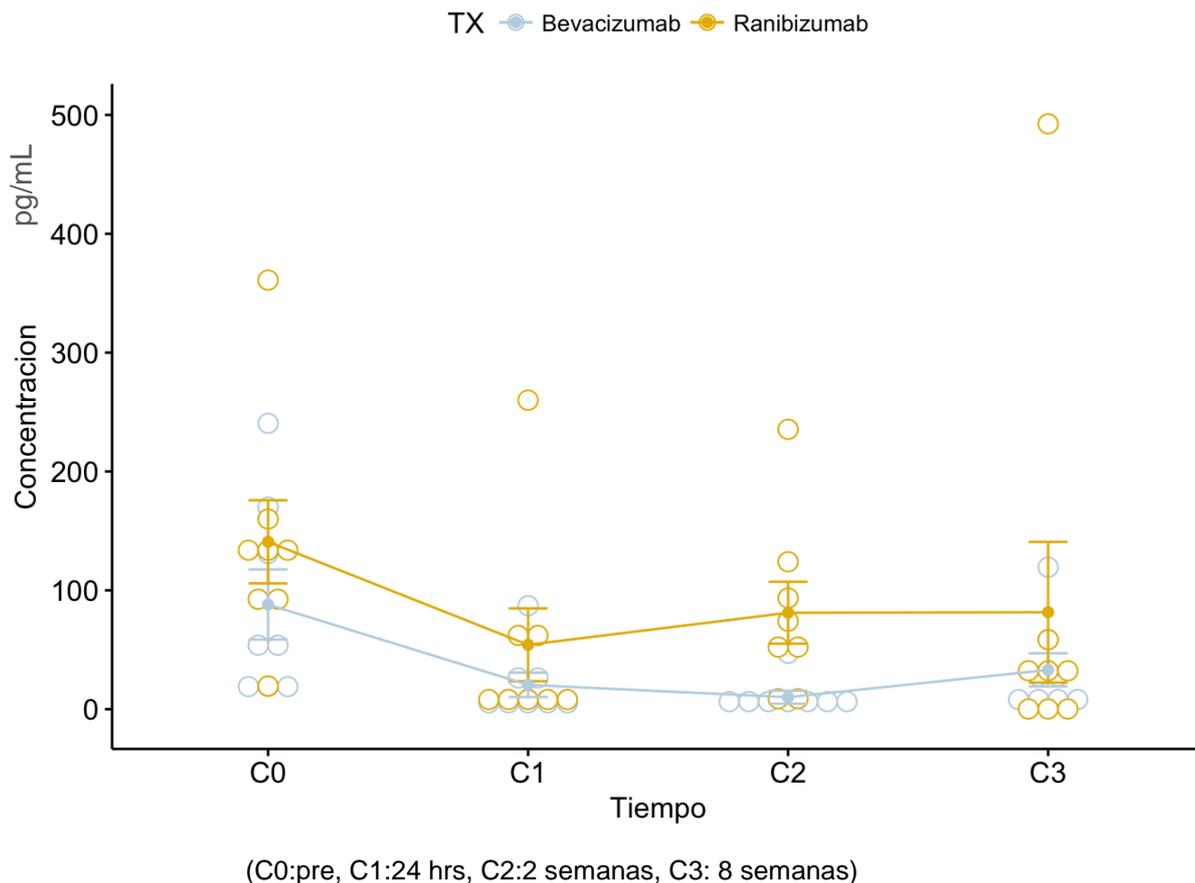
Tabla 3 Concentraciones séricas de VEGF del grupo de Ranibizumab

PAC	C0	C1	C2	C3	Tratamiento de rescate
2	138.50	16.00	74.00	36.50	
3	129.00	58.00	93.50	58.50	
5	92.00	66.00	52.00	28.00	
7	361.00	260.00	235.50	492.50	
10	93.00	8.50	52.50	<LD	
12	160.00	13.50	124.00	NA	
13	133.50	11.00	12.50	NA	+

<LD: menor al límite de detección, NA: No acudió

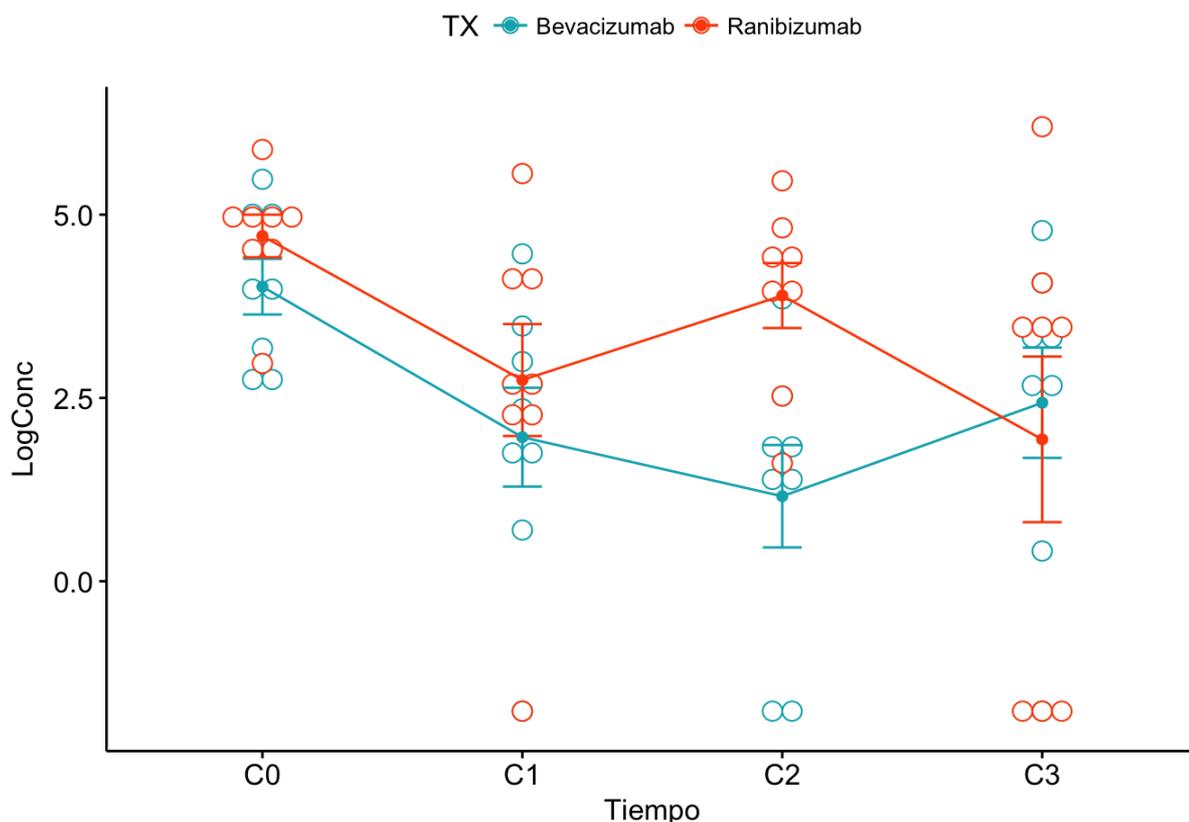
Comparación de los niveles séricos de VEGF

Se realizó un análisis de varianza factorial de medidas repetidas para realizar la comparación de los niveles séricos de VEGF en ambos grupos donde no se observa diferencia estadísticamente significativa con una $p=0.19$. Se puede ver la distribución de las concentraciones según el tiempo de la toma de muestra, donde se observa un patrón similar en ambos tratamientos.

Gráfica 1 Concentraciones de VEGF por tiempo de muestreo

Ya que los datos no siguen normalidad y las varianzas no son homogéneas, se convirtieron a logaritmo para volver a realizar el análisis.

Como resultado se observa que existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de ambos grupos de tratamiento con una $p=0.03$ así como la diferencia de concentraciones entre los diferentes tiempos de muestreo, con una $p=0.000$ (Gráfica 1). Por la transformación de los datos a logaritmos se evidencia una diferencia en las concentraciones de la toma de las 2 semanas que no se pudo observar con tal claridad en la gráfica previa.

Gráfica 2 Logaritmo de las concentraciones séricas del VEGF.

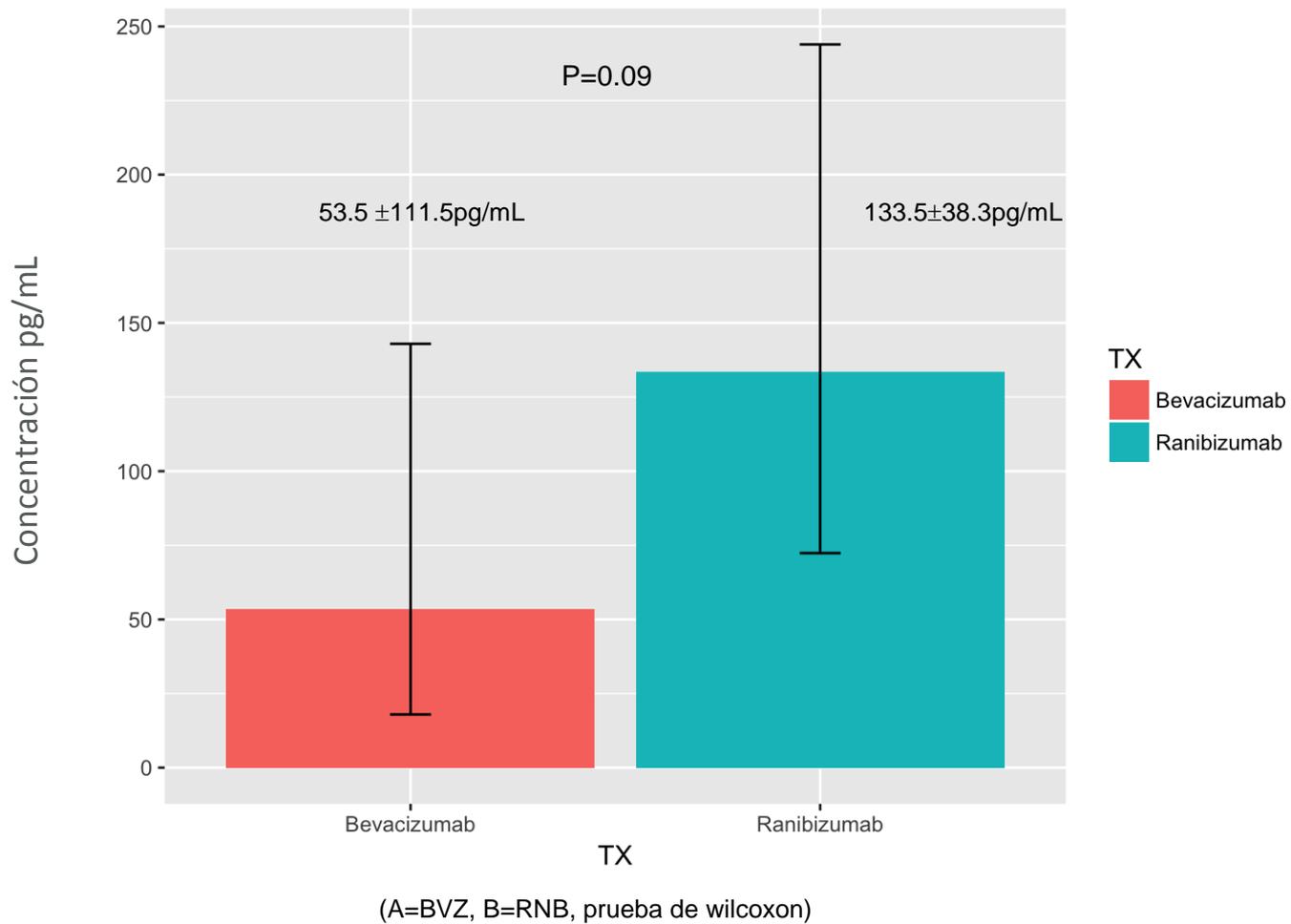
(LogConc: Logaritmo de concentración, C0:pre, C1:24 hrs, C2:2 semanas, C3: 8 semanas)

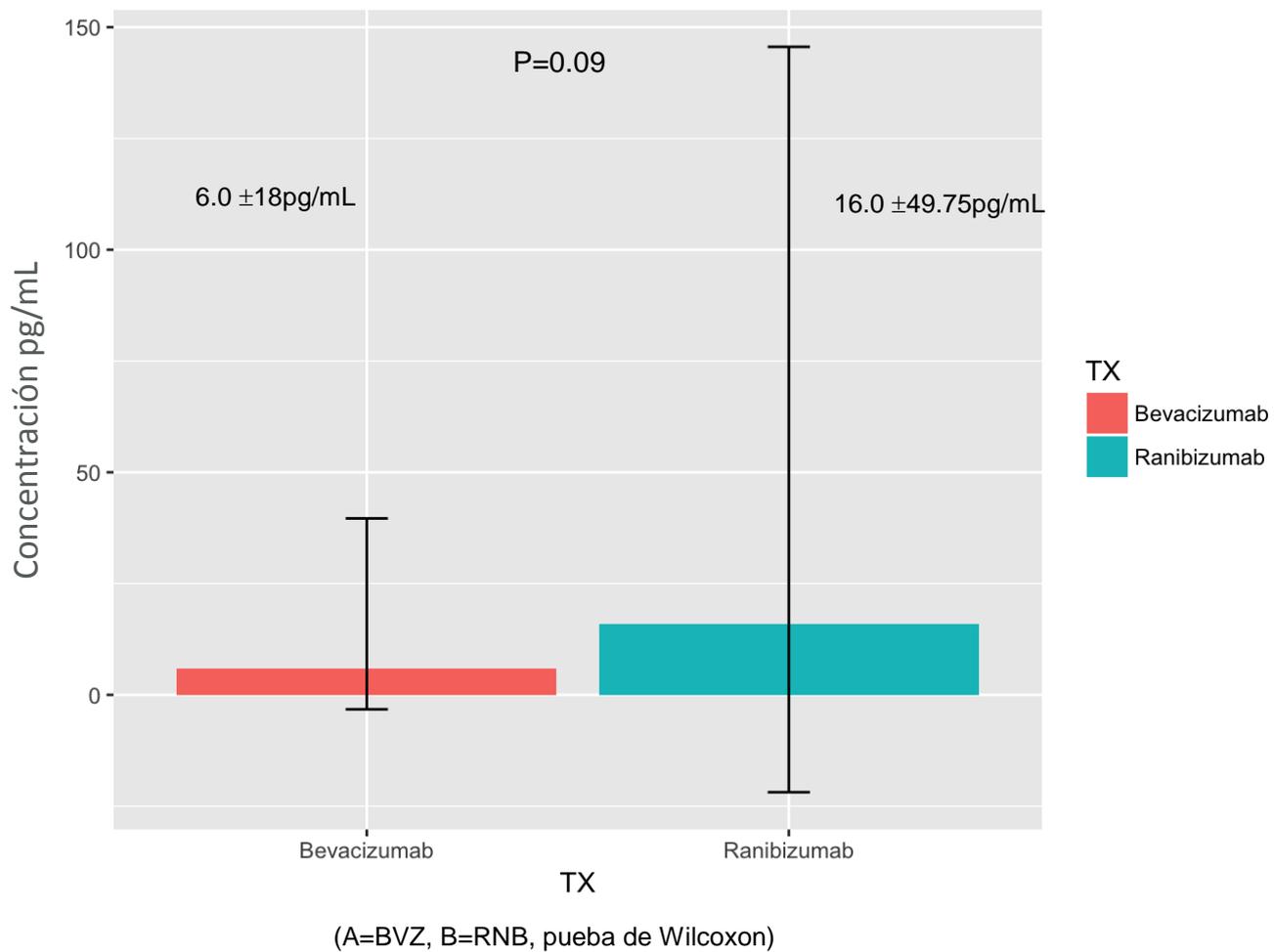
Dado que los grupos no se encuentran balanceados (9 grupo A, 7 del grupo B) se eligió a uno de los pacientes del grupo A, para ser del grupo B, esto por requerimientos de la prueba estadística a realizar. El paciente elegido fue el #1.

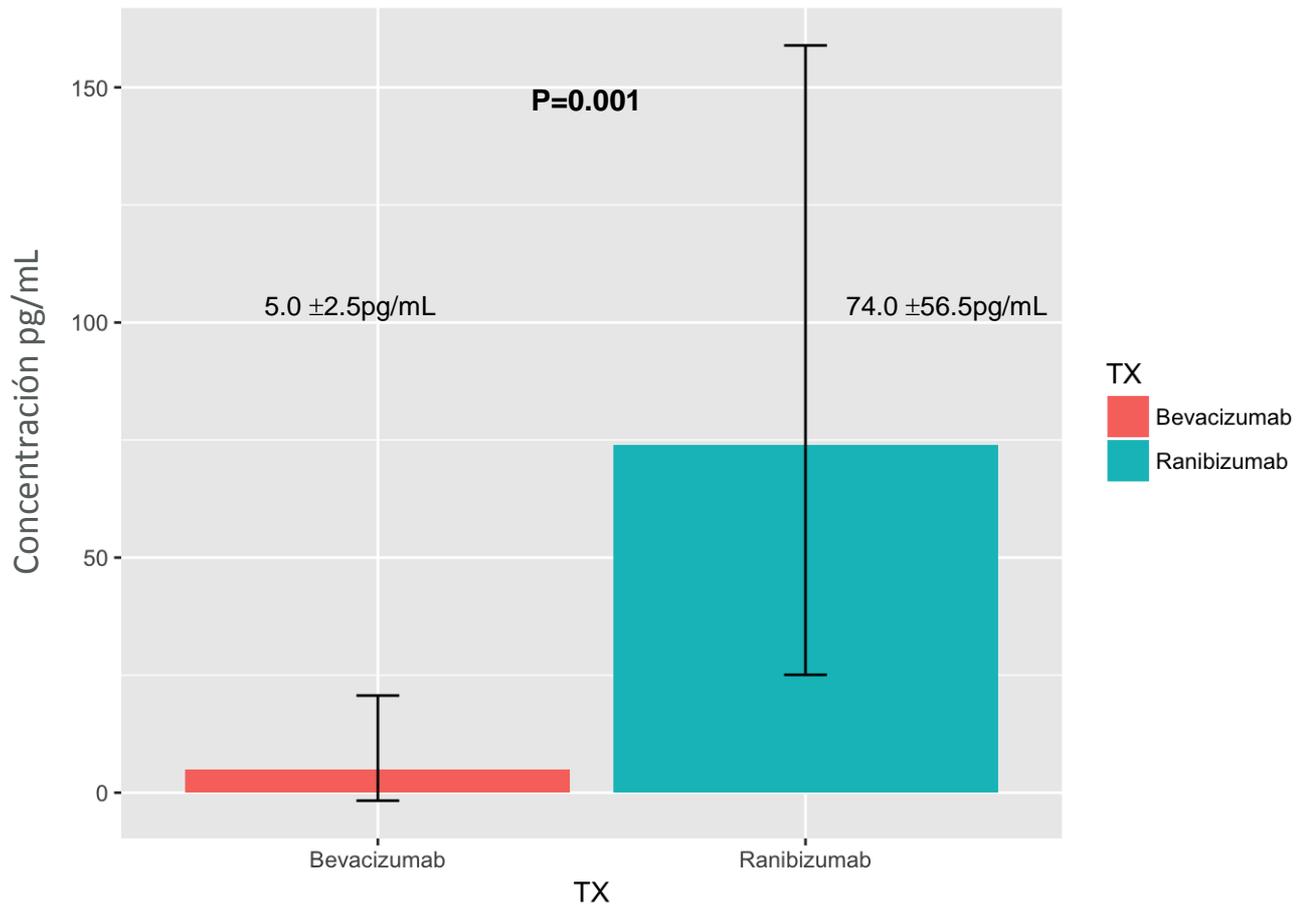
Se realizó el análisis posthoc con la prueba de Bonferroni, donde ninguna de las comparaciones realizadas tuvo una diferencia estadísticamente significativa.

Niveles séricos de VEGF por grupos

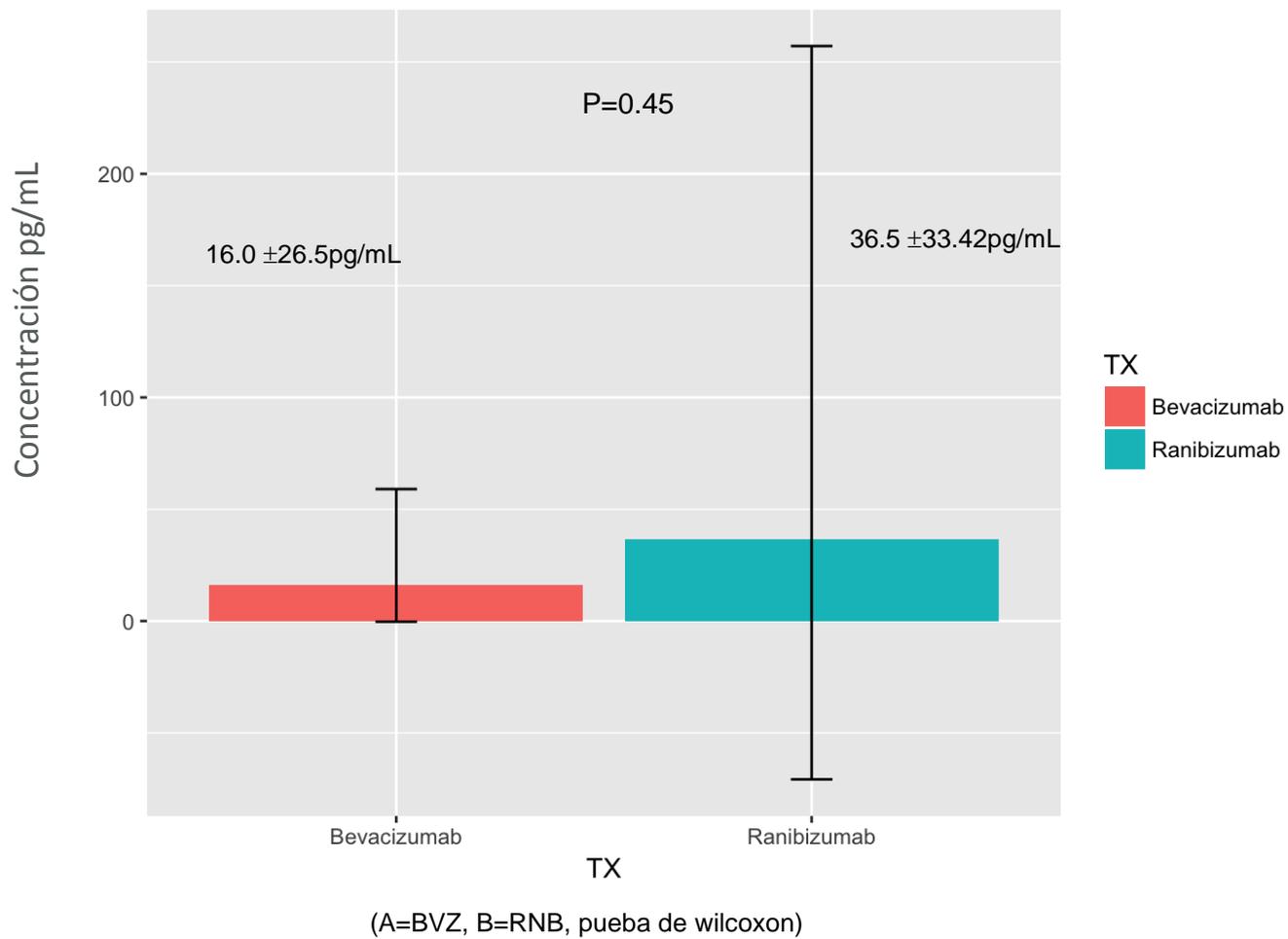
Ya que tras realizar el análisis posthoc del ANOVA de medidas repetidas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se realizó un análisis entre ambos grupos por cada tiempo de muestreo. Los niveles séricos de los pacientes de ambos grupos, así como la comparación se observan en las gráficas siguientes.

Gráfica 3 Comparación de VEGF previo a la aplicación del tratamiento

Gráfica 4 Comparación de VEGF a las 24 hrs del tratamiento

Gráfica 5 Comparación de VEGF a las 2 semanas del tratamiento

(A=BVZ, B=RNB, prueba de wilcoxon)

Gráfica 6 Comparación de VEGF a las 8 semanas del tratamiento

Grupo control

Debido a que no existe una cifra o rango de referencia para el VEGF en esta edad, se tomaron muestras aleatorias a 15 controles con antecedente de prematuridad sin retinopatía del prematuro, previa autorización de sus padres mediante la firma de consentimiento informado.

Las características demográficas del grupo control se muestran en la tabla 4.

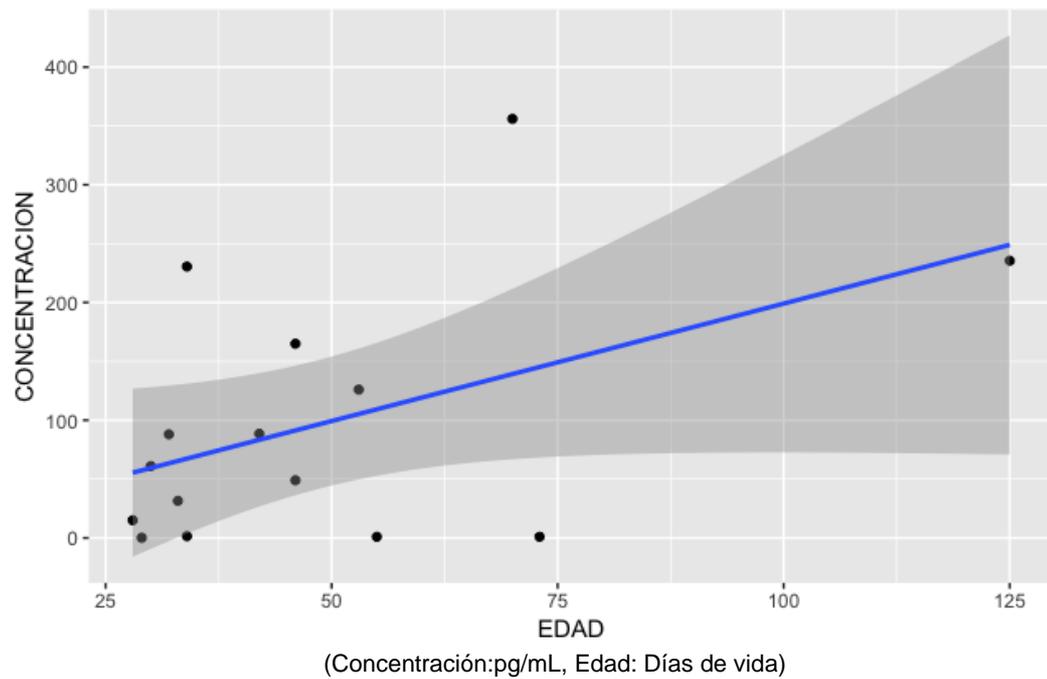
Tabla 4 Datos demográficos grupo control

Variable	N=15
Sexo (M/F)	11(73.3%)/4(26.7%)
Peso al nacer (g)	1610 +- 302.72 §
Semanas de gestación (semanas)	34 +- 1.5 Ʒ
Edad actual (días)	42 +- 25.5 §
Concentración de VEGF(pg/mL)	61 +- 137.25 Ʒ

§ Media y DE, Ʒ Mediana y RIQ

Las concentraciones séricas del grupo control se muestran en la siguiente gráfica, según la edad. Se realizó un análisis de correlación entre estas variables, donde se encontró una correlación de 0.35 con una $p=0.19$.

Gráfica 7 Gráfica de correlación entre Edad y Concentracion de VEGF del grupo control



Dentro de los resultados de este grupo cabe destacar que en 4 de los pacientes los niveles se encontraron cercanos al 0 y que, como en los grupos de tratamiento, los valores tuvieron gran variabilidad.

Seguridad

No se presentaron reacciones adversas o complicaciones oftalmológicas como catarata, hemovítreo o endoftalmitis. A nivel sistémico no se observaron complicaciones o reacciones adversas como apneas o paro cardiorrespiratorio posterior a la aplicación de los antiangiogénicos.

En dos pacientes del grupo de BVZ fue necesario el tratamiento de rescate, uno de ellos por falta de respuesta en el que se reaplicó el tratamiento y en el segundo por recidiva de la enfermedad por lo que fue necesaria la realización de vitrectomía en ojo izquierdo.

En el grupo de RNB, un paciente recibió tratamiento de rescate con la reaplicación de antiangiogénico, posteriormente láser y al final la realización de vitrectomía por falta de respuesta a los tratamientos.

Cabe mencionar que los niveles de VEGF de estos pacientes, disminuyeron después de la aplicación del tratamiento, sin ver recuperación de los mismos a las 2 semanas de la aplicación y no se puede afirmar que dichos valores no volvieron a los niveles normales, ya que en 2 de ellos no se pudo tomar la muestra correspondiente a las 8 semanas. Sin embargo el paciente que si cuenta con todas las muestras, tuvo un comportamiento anormal de las concentraciones, ya que los resultados correspondientes a las 8 semanas se encontró debajo de límites de detección.

9. DISCUSIÓN

La realización del tamiz oftalmológico detecta ROP y permite aplicar el tratamiento de forma temprana. Actualmente se emplean como tratamiento los antiangiogénicos, que contribuyen a desarrollar la vasculatura retiniana, obteniendo así un campo visual completo, a comparación de lo que sucede en los pacientes a quienes se les aplicó láser.

Estos tratamientos tienen como posible complicación y/o efecto adversos, el paso del medicamento a la circulación sistémica y la consecuente disminución del VEGF sistémico, que a esta edad juega un papel crucial en el desarrollo de los tejidos del neonato.

El objetivo de este estudio fue comparar los niveles séricos del VEGF posterior a la aplicación intravítrea de RNB o BVZ, en distintos tiempos de seguimiento.

Los resultados de este trabajo muestran que la concentración de VEGF disminuye en ambos grupos, después de la aplicación de los medicamentos.

Existe diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de VEGF de los pacientes tratados con BVZ en comparación con los de RNB ($p=0.03$).

La aplicación de BVZ, ocasionó niveles menores en comparación con RNB, a pesar de haber aplicado una dosis menor a la convencional.

Esto se observó en estudios previos⁽³³⁻³⁵⁾ donde aplicaron BVZ (dosis habitual) y se observó una disminución de los niveles de VEGF de forma sostenida durante al menos 8 semanas, a diferencia de lo que se encuentra reportado para RNB donde los niveles disminuyeron a las 24 h y posteriormente se encontraban cercanos a los niveles basales a los 7 días de la aplicación. ⁽³⁶⁻³⁷⁾

Esto contrasta con los resultados de nuestros pacientes, en la muestra de las 2 semanas donde encontramos una mayor diferencia entre grupos ($p=0.001$), también se observa una tendencia a la recuperación de los niveles del grupo de RNB, a diferencia de lo que ocurrió a las 8 semanas, donde en ambos grupos se observan niveles bajos de alrededor de 50 pg/mL.

Los niveles obtenidos para el grupo de BVZ fueron menores desde la toma previa a la aplicación del tratamiento, aunque no existe una diferencia estadísticamente significativa.

Una característica de los datos obtenidos, es la gran variabilidad del VEGF. Las diferencias encontradas en este y el resto de los estudios puede estar relacionada a variables propias de los prematuros, el uso de oxígeno, las enfermedades concomitantes como sepsis, anemia y enterocolitis.

Es necesario realizar un estudio donde se incluyan todas las variables que pudieran influir para caracterizar de forma más precisa el comportamiento del VEGF.

Además es importante tomar en cuenta algunos aspectos técnicos utilizados para la medición del VEGF en cada uno de los trabajos.

Por ejemplo: El kit de ELISA utilizado en el estudio de Pieh ⁽¹⁸⁾ fue el kit Quantikine (R&D Systems). Según su ficha técnica, presenta reacción cruzada o interferencia con los receptores 1 y 2 del VEGF en niveles > 500 pg/mL y >2000 pg/mL respectivamente. El kit empleado en nuestro estudio tiene las siguientes características: tiene interferencia o reacción cruzada con el VEGF-121, con una sensibilidad menor de 5 pg/mL, por lo que los resultados no son equiparables.

Debido a esto y a que no existe un rango determinado del VEGF en prematuros, se realizó una nueva búsqueda de información enfocada en este tema. De ésta búsqueda encontramos los siguientes datos.

Goswami y colaboradores midieron el VEGF y su receptor en pacientes con y sin ROP a las 32 semanas y posteriormente a las 38 semanas corregidas. En ambos grupos hubo disminución de las concentraciones del VEGF en la visita subsecuente, sin que esto estuviera relacionado con algún agente terapéutico⁽⁵³⁾.

La variabilidad y el descenso del VEGF se observaron también en los estudios de Pieh y Hellgren⁽¹⁸⁻¹⁹⁾, donde tampoco se vió involucrado algún tratamiento farmacológico.

En el caso de este trabajo, en pacientes del grupo de tratamiento se observó una tendencia a la disminución de los niveles del VEGF con el paso del tiempo, así como algunos de los prematuros del grupo control presentaron niveles cercanos al 0.

Esto nos pudiera indicar que el VEGF de los prematuros va disminuyendo con el paso del tiempo, ya que, probablemente en ese tiempo los órganos terminan su desarrollo y su requerimiento de los factores de crecimiento es menor conforme mayor es la edad.

Esto se observa también dentro de los resultados del grupo control, dónde se observan algunos niveles cercanos al 0 en bebés que son mayores de los 50 días de vida.

Sin embargo, no podemos confirmar esta teoría, ya que tenemos pocos casos controles en los que solo se obtuvo una medición del VEGF y la mayoría se encuentran en edades cercanas a los 30 días de vida.

Por lo tanto, es necesario evaluar los niveles en pacientes de mayor edad e incluso considerar realizar muestras repetidas para valorar el comportamiento del VEGF en este periodo, similar a los estudios previamente mencionados así como valorar las condiciones sistémicas de forma individual.

Por ejemplo los pacientes 1, 4, 14 de los grupos de tratamiento, tuvieron niveles de VEGF menores desde antes de la aplicación del tratamiento y se mantuvieron así a lo largo del tiempo de seguimiento. Tienen en común el antecedente del uso de O₂ de forma prolongada (ventilación mecánica) y se sabe que el uso del mismo o sus altas concentraciones pueden inhibir la presencia del VEGF.

Otro dato obtenido en la búsqueda reciente de información es un reporte de Kandasamy y colaboradores donde se intenta determinar un rango del VEGF en pacientes recién nacidos de término. En ese proyecto se obtuvieron también concentraciones de 32 pacientes, que presentaron gran variabilidad de 976 (394-1635) pg/mL ⁽⁵⁴⁾.

En comparación con los resultados de este trabajo existe una gran diferencia, ya que los niveles basales de ningún paciente de los 3 grupos superaron los 500 pg/mL.

Lo anterior pudiera indicar que los pacientes prematuros presentan niveles menores de VEGF desde el nacimiento en comparación con pacientes de término.

Todo lo anterior nos lleva a la teoría de que, aunque se ha demostrado en diversas publicaciones que los antiangiogénicos aplicados de forma intravítrea disminuyen el VEGF sistémico, pudieran no ser 100% responsables de este cambio a largo plazo, si no que puede ser un fenómeno que se presenta de forma fisiológica ó por algunos otras variables que pueden tener efecto en el mismo, como el uso de O₂ o enfermedades y condiciones sistémicas.

La realidad es que este fenómeno debe de ser investigado más a fondo.

De los 16 pacientes incluidos solamente 3 fueron candidatos a retratamiento, en comparación con el estudio de Zhou y colaboradores donde presentaron recurrencia 10 ojos de los 22 incluidos en el estudio.

Por lo tanto se observa que en nuestro grupo de pacientes los tratamientos fueron efectivos en la mayoría de los casos y similar a lo sucedido en trabajos previos no observamos ningun caso de efectos secundarios o complicaciones oftalmológicas y sistémicas como: catarata, endoftalmitis, hemorragia vítrea, apnea, paro cardiorrespiratorio.

Con estos resultados hasta el momento, no podemos descartar o afirmar que la disminución de VEGF en bebés prematuros posterior a la aplicación intravítrea de antiangiogénicos presente un patrón dependiendo de cada medicamento, ya que los niveles tienen una gran variabilidad y además que podemos encontrar el VEGF bajo sin tener una relación con estos medicamentos, como observamos en algunos de los casos del grupo control.

10. LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS

La principal limitante que se presentó en el desarrollo de este trabajo de investigación fue la disminución en la incidencia de ROP en pacientes del Hospital Central, por lo que no se logró completar el tamaño de muestra requerido de 20 pacientes.

Para realizar el análisis posthoc se tuvieron que balancear los grupos, además de que se tuvo que realizar imputación de datos, que aunque fueron menores del 20%, dada la variabilidad de los mismos, los resultados deben tomarse con cautela.

En cuanto a nuevas perspectivas, es importante considerar la realización de un estudio multicéntrico que nos pudiera ayudar a determinar un rango del VEGF en suero de los pacientes prematuros y su evolución a través del periodo neonatal para poder determinar de una forma más precisa el rol que desempeñan los antiangiogénicos en la disminución del VEGF o si es un fenómeno que ya existía a pesar de ellos.

Así mismo, es necesario realizar un seguimiento de los pacientes tratados con antiangiogénicos, sobretodo valorando los efectos refractivos que puedan presentarse así como las alteraciones en el neurodesarrollo entre otras, para determinar con mayor certeza la seguridad de los mismos.

11. CONCLUSIONES

Los pacientes tratados con Bevacizumab presentaron menores niveles séricos de VEGF posterior a la aplicación del tratamiento.

Sin embargo, ambos grupos tuvieron disminución de los niveles séricos de VEGF que no volvieron a sus niveles basales al final del seguimiento.

Los pacientes del grupo control, así como los grupos de tratamiento, presentaron una gran variabilidad de los niveles de VEGF.

No se presentó ninguna reacción adversa ó complicación de la aplicación del tratamiento, tanto a nivel oftalmológico como sistémico.

Bevacizumab por su menor costo y resultados positivos, puede considerarse una opción viable en nuestro medio

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Hellström A, Smith LEH, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *Lancet*; 26 Oct 2013;382(9902):1445-1457.
2. Carrion JZ, Filho JBF, Tartarella MB, Zin A, Jornada ID. Prevalence of retinopathy of prematurity in Latin America. *Clin Ophthalmol*. 2011;5(1):1687-1695
3. Detección, Diagnóstico y Tratamiento de Retinopatía del Prematuro en el Segundo y Tercer Nivel de Atención. México: Secretaría de Salud; 2 de julio de 2015.
4. De la Fuente Torres MA. Definición y realidad nacional. En: Retinopatía del prematuro. [en línea]. 2011. P.21-7. [consulta 15 de julio de 2016] Disponible en: http://www.v2020la.org/images/ROP_Mexico.pdf
5. Cavallaro G, Filippi L, Bagnoli P, La Marca G, Cristofori G, Raffaeli G, et al. The pathophysiology of retinopathy of prematurity: An update of previous and recent knowledge. *Acta Ophthalmol*. 2014 Feb;92(1):2-20.
6. Grünewald FS, Prota AE, Giese A, Ballmer-Hofer K. Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2010 Mar;1804(3):567-580.
7. Chong V. Biological, preclinical and clinical characteristics of inhibitors of vascular endothelial growth factors. *Ophthalmologica*. 2012;227:02-10.
8. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev*. 2004 Ago; 25(4):581-611
9. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J, The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun; 9(6):669-676
10. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; C1358-1366
11. Tolentino M. Systemic and Ocular Safety of Intravitreal Anti-VEGF Therapies for Ocular Neovascular Disease. *Surv Ophthalmol*, 2011 Mar;56(2):95-113.
12. Gerber HP, Hillian KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*. 1999 Mar; 126(6):1149-1159.
13. Carmeliet P, Ruiz C. VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2013 May;70(10):1763-1778
14. Schlieve CR, Mojica SG, Holoyda KA, Hou X, Fowler KL, Grikscheit TC. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Bioavailability Regulates Angiogenesis and Intestinal Stem and Progenitor Cell Proliferation during Postnatal Small Intestinal Development. *Plos One*. Mar 2016;11(3):e0151396.
15. Wieck MM, Spurrier RG, Levin DE, Mojica SG, Hiatt MJ, Reddy R, et al. Sequestration of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Induces Late Restrictive Lung Disease. *PlosOne*. 2016 Feb;11(2):e0148323.

16. Matthews JA, Sala FG, Speer AL, Li Y, Warburton D, Grikscheit TC. Mesenchymal-Specific Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Attenuates Growth in Neonatal Mice. *J Surg Res*. 2012 Ene; 172(1):40-47.
17. Machado FG, Kuriki PS, Fujihara CK, Fanelli C, Arias SCA, Malheiros DMAC, et al. Chronic VEGF blockade worsens glomerular injury in the remnant kidney model. *PLoS One* 2012;7(6):e39580.
18. Pieh C, Agostini H, Buschbeck C, Kruger M, Schulte-Monting J, Zirrgiebel U, et al. VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Tie levels in plasma of premature infants: relationship to retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol*. 2008 May;92(5):689-693.
19. Hellgren G, Löfqvist C, Hård AL, Hansen-Pupp I, Gram M, Ley D, et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in relation to retinopathy of prematurity. *Pediatr Res*; 2016 Ene; 79(1):70-75.
20. International Committee for the Classification or Retinopathy of Prematurity. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol*, 2005 Jul;123(7):991-9.
21. Good W V. Final results of the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP) randomized trial. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2004;102:233-48-50.
22. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Three-month outcome. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Arch Ophthalmol*. 1990 Feb;108(2):195-204.
23. Azanza Perea JR, García Layana A. Ranibizumab frente a bevacizumab. Consideraciones farmacológicas. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2012;87:3-9.
24. Alba LE, Zaldua RA, Masini RA. Off-label use of intravitreal bevacizumab for severe retinopathy of prematurity. *Arch la Soc Esp Oftalmol*; 2015 Feb;90(2):81-86.
25. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ, BEAT-ROP Cooperative Group, Keefe MO. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*. 2011 Feb;364(7):603-15.
26. Menke MN, Framme C, Nelle M, Berger MR, Sturm V, Wolf S. Intravitreal ranibizumab monotherapy to treat retinopathy of prematurity zone II, stage 3 with plus disease. *BMC Ophthalmol*. 2015 Mar;15:20.
27. Chen S-N, Lian I, Hwang Y-C, Chen Y-H, Chang Y-C, Lee K-H, et al. Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor treatment for retinopathy of prematurity: comparison between Ranibizumab and Bevacizumab. *Retina*, 2015 Abr;35(4):667-74
28. Martínez-Castellanos MA, Schwartz S, García-Aguirre G, Quiroz-Mercado H. Short-term outcome after intravitreal ranibizumab injections for the treatment of retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol*. 2013 Jul;97(7):816-9.
29. Erol MK, Coban DT, Sari ES, Bilgin AB, Dogan B, Ozdemir O, et al. Comparison of intravitreal ranibizumab and bevacizumab treatment for retinopathy of prematurity. *Arq Bras Oftalmol*. 2015 Nov;78(6):340-3.
30. Arámbulo O, Dib G, Iturralde J, Duran F, Brito M, Fortes JB. Intravitreal ranibizumab as a primary or a combined treatment for severe retinopathy of prematurity. *Clin Ophthalmol*. 2015;9:2027-32.

31. Fonseca Santodomingo A. Crecimiento postnatal del ojo y sus anejos. En: Fonseca Santodomingo A, Abelarais Gómez J, Peralta Calvo J. Actualización en Cirugía Oftálmica Pediátrica [en línea]. Madrid: MAC LINE; 2000. [consulta 15 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.oftalmo.com/publicaciones/pediatrica/cap01.htm>
32. Rangel MG. Estudio de no inferioridad entre dos dosis (0.500 mg y 0.625 mg) de bevacizumab intravítreo en la regresión de la ROP tipo 1 Estudio Clínico Controlado Aleatorizado. Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2014.
33. Sato T, Wada K, Arahori H, Kuno N, Imoto K, Iwahashi-Shima C, et al. Serum concentrations of bevacizumab (Avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol*; 2012 Feb;153(2):327-333.e1.
34. Hong YR, Kim YH, Kim SY, Nam GY, Cheon HJ, Lee SJ. Plasma Concentrations of Vascular Endothelial Growth Factor in Retinopathy of Prematurity After Intravitreal Bevacizumab Injection. *Retina*. 2015 Sep; 35(9):1772-6.
35. Wu WC, Lien R, Liao PJ, Wang NK, Chen YP, Chao AN et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor and related factors after intravitreal bevacizumab injection for retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol*. 2015 Abr;133(4):391-7.
36. Hoerster R, Muether P, Dahlke C, Mehler K, Oberthür A, Kirchhof B et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in an infant treated with ranibizumab for retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol*. 2013 Feb; 91(1):74-5
37. Zhou Y, Jiang Y, Bai Y, Wen J, Chen L. Vascular endothelial growth factor plasma levels before and after treatment of retinopathy of prematurity with ranibizumab. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015 Ene; 254(1):31-6.
38. Wu WC, Shih CP, Lien R, Wang NK, Chen YP, Chao AN, et al. Serum Vascular Endothelial Growth Factor After Bevacizumab or Ranibizumab Treatment for Retinopathy of Prematurity. *Retina*. 2016 Jul;0(0):1-8.
39. Martínez-Castellanos MA, Schwartz S, Hernández-Rojas ML, Kon-Jara VA, García-Aguirre G, Guerrero-Naranjo JL, et al. Long-term effect of antiangiogenic therapy for retinopathy of prematurity up to 5 years of follow-up. *Retina*. 2013 Feb;33(2):329-38.
40. Araz-Ersan B, Kir N, Tuncer S, Aydinoglu-Candan O, Yildiz-Inec D, Akdogan B, et al. Preliminary anatomical and neurodevelopmental outcomes of intravitreal bevacizumab as adjunctive treatment for retinopathy of prematurity. *Curr Eye Res*; 2015 May;40(6):585-91.
41. Lien R, Yu M-H, Hsu K-H, Liao P-J, Chen Y-P, Lai C-C, et al. Neurodevelopmental Outcomes in Infants with Retinopathy of Prematurity and Bevacizumab Treatment. *PLoS One*. 2016 Ene;11(1):e0148019.
42. Morin J, Luu TM, Superstein R, Ospina LH, Lefebvre F, Simard M-N, et al. Neurodevelopmental Outcomes Following Bevacizumab Injections for Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics*. 2016 Abr;137(4).
43. Cohen J. The t test for means. En: Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2ª Ed. Estados Unidos: Lawrence Erlbaum Associates Publishers; 1988. 19-74 p.

44. Sankar MJ, Sankar J, Mehta M, Bhat V, Srinivasan R. Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs for treatment of retinopathy of prematurity. *Cochrane database Syst Rev.* 2016;2:CD009734.
45. Quiroz-Mercado H, Martinez-Castellanos MA, Hernández-Rojas ML, Salazar-Terán N, Chan RVP. Antiangiogenic Therapy With Intravitreal Bevacizumab for Retinopathy of Prematurity. *Retina* 2008 Mar;28(3):S19-25.
46. Moja L, Lucenteforte E, Kwag KH, Bertele V, Campomori A, Chakravarthy U, et al. Systemic safety of bevacizumab versus ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane database Syst Rev.* 2014 Sep;9(9):CD011230.
47. Thulliez M, Angoulvant D, Le Lez ML, Jonville-Bera A-P, Pisella P-J, Gueyffier F, et al. Cardiovascular Events and Bleeding Risk Associated With Intravitreal Antivascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibodies: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Ophthalmol.* 2014 Nov;132(11):1317-26.
48. Zhang XY, Guo XF, Zhang SD, He JN, Sun CY, Zou Y, et al. Comparison of bevacizumab and ranibizumab in age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Int J Ophthalmol.* 2014 Abr;7(2):355-64.
49. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006 Oct;355(14):1432-44.
50. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, Wordsworth S, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: One-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology;* 2012 Jul;119(7):1399-411.
51. 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 Oct;355(14):1419-31.
52. Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, Grunwald JE, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: Two-year results. *Ophthalmology;*2012 Jul;119(7):1388-98.
53. Goswami B, Goyal M, Beri S, Garg R, Saili A, Jain A. Role of serum levels of Vascular Endothelial Growth Factor and its receptor in retinopathy of prematurity. *Indian J Pediatr.* 2015 Ago;25(4): e2373.
54. Kandasamy Y, Hartley L, Rudd D. Vascular endothelial growth factor-A levels in term neonates. *J Child Sci* 2017; 7(1) e151:e154.

13. ANEXOS.

ANEXO I ESTUDIOS DE BEVACIZUMAB COMO TRATAMIENTO PARA ROP

Existen múltiples publicaciones acerca del uso off-label de bevacizumab, sin embargo la mayoría de ellos son reportes de estudios retrospectivos.

Existe una revisión sistemática del grupo Cochrane en el que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la menor recurrencia en el grupo de los pacientes tratados con BVZ vs los pacientes tratados con láser (RR 0.22 IC 95% 0.08-0.62), sin embargo también se menciona que son necesarios más estudios con la finalidad de evaluar los resultados funcionales y estructurales a largo plazo, así como las posibles alteraciones en el neurodesarrollo y función cardíaca. ⁽⁴⁴⁾

En México existen diversas publicaciones acerca del uso de Bevacizumab como tratamiento de la ROP. Desde el 2008 Quiróz y colaboradores, reportaron los resultados de un estudio observacional prospectivo en el que se valoraron a 13 pacientes que presentaron regresión de la enfermedad en todos ellos posterior a la aplicación del medicamento intravítreo. ⁽⁴⁵⁾

ANEXO II PROTOCOLO PARA LA APLICACIÓN DE MEDICAMENTOS INTRAVITREOS

Se explica el procedimiento y se solicita la autorización mediante la firma del consentimiento informado de ambos padres.

Bajo anestesia tópica, se aplica yodopovidona al 5% en fondo de saco conjuntival, se realiza asepsia y antisepsia en la región periocular, se colocan campos estériles, se coloca blefarostáto pediátrico, se realiza marcaje de la conjuntiva a 1.5 mm del limbo esclerocorneal en el sector nasal inferior con un compás especial, se aplica medicamento intravítreo, se aplica presión con hisopo en el sitio de punción para evitar reflujo del medicamento y/o salida de vítreo, posteriormente se aplica antibiótico tópico (Moxifloxacino) el cual se aplicará durante 7 días posteriores cada 3 horas. Se limpia la zona con agua estéril. Se realiza el mismo procedimiento en el ojo contralateral.

ANEXO III TÉCNICA DE ELISA

La técnica de ELISA está basada en el uso de antígenos o anticuerpos que se marcan con una enzima, lo que ocasiona que juntos tengan actividad enzimática e inmunológica. Lo que nos permite observar, mediante la adición de un substrato específico, la acción de la enzima utilizada. Esta se puede observar y cuantificar mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. Hay diferentes tipos de ELISA, el que se realizará en este trabajo será la ELISA tipo sandwich.

En el caso de los kits que se realizarán en este estudio la información es la siguiente:

Marca	Novex ®
Número de catalogo	de KHG01111/KHG0112
Número de Tests	96 tests
Sensibilidad	< 5 pg/mL

La técnica es la siguiente:

- 1.- Se fijan los anticuerpos específicos del agente que queremos detectar a un soporte insoluble, se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 2.- Se realiza un lavado para eliminar los anticuerpos que no se fijaron.
- 3.- Se coloca el plasma para que se una con el anticuerpo que ya se encuentra fijado al soporte. Se realiza un lavado para eliminar los que no se hayan unido.
- 4.- Se adicionan anticuerpos específicos para el agente que queremos detectar, estos deben de tener una estructura diferente a los que adicionamos en el paso 1 y además están combinados con una enzima. Realizamos nuevamente un lavado.
- 5.- Se añade una sustancia que sea capaz de actuar sobre la enzima marcadora.
- 6.- Se realiza la lectura visual o colorimétrica del producto final.

Ilustración 3 Esquema de la técnica ELISA Sandwich.



ANEXO IV CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Cuadro 8 Cronograma de actividades

	Julio- Diciembre 2016	Enero- Abril 2017	Mayo- Diciembre 2017	Enero- Julio 2018	Agosto 2018
PROYECTO DE PROTOCOLO					
APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA					
RECOLECCION DE DATOS					
ANALISIS DE DATOS					
PRESENTACION DE RESULTADOS					

ANEXO V ESTUDIOS DE SEGURIDAD DE ANTIANGIOGÉNICOS EN ADULTOS CON DIAGNÓSTICO DE DMRE.

Debido al paso a la circulación sistémica de los medicamentos intravítreos, se han realizado estudios de seguridad de Ranibizumab/Bevacizumab, sobre todo en adultos con DMRE, donde se documentaron pocos efectos secundarios oculares como endoftalmitis, catarata, hipertensión ocular. En cuanto a eventos sistémicos se observaron eventos protrombóticos, hipertensión y sangrado no ocular. ⁽⁴⁶⁾

Sin embargo, es difícil asegurar que estos eventos que se presentan en adultos se encuentran directamente relacionados con la aplicación del medicamento vía intravítrea, ya que estos estudios se realizaron en pacientes con otras comorbilidades como diabetes mellitus, hipertensión, etc, que pueden influir en la aparición de eventos adversos. ⁽⁴⁶⁻⁵²⁾

Cuadro 9 Estudios de Seguridad de antiangiogénicos en pacientes Adultos

ESTUDIO	DISEÑO	PATOLOGIA Y FÁRMACO	EVENTOS ADVERSOS SISTÉMICOS
ANCHOR⁽⁴⁹⁾	ECCA Multicéntrico , Doble-ciego 423 pacientes	DMRE (Ranibizumab 0.3 y 0.5 mg Terapia fotodinámica TFD)	Hipertensión: 8.6% Ranibizumab vs 8.4% TFD Infarto 2.8% Ranibizumab vs 0.7% TFD Sangrado no ocular: RBZ 0.3 mg 5.1%, 0.5 mg 6.4%, vs 2.1% TFD
IVAN⁽⁵⁰⁾	Multicéntrico factorial de no inferioridad 610 pacientes	DMRE (Ranibizumab vs Bevacizumab)	Infarto o falla cardiaca: < Bevacizumab OR 0.23 IC 0.05-1.07 p= 0.03 No hubo diferencia entre ambos tratamientos en cuanto a la aparición de eventos adversos importantes OR:1.35 IC 0.8-2.27.
MARINA⁽⁵¹⁾	ECCA, multicéntrico doble-ciego 716 pacientes	DMRE (Ranibizumab 0.3 mg-0.5mg vs placebo)	Eventos adversos similares en los 3 grupos: hipertensión, eventos protrombóticos, sangrado no ocular durante los 12 meses iniciales.
CATT⁽⁵²⁾	ECCA, multicéntrico , aleatorizado 1107 pacientes	DMRE (Ranibizumab mensual/PRN vs Bevacizumab mensual/PRN)	La tasa de muerte y eventos protrombóticos fue similar para ambos tratamientos p= 0.06. La incidencia de un evento adverso importante fue mayor en el grupo de bevacizumab (39.9% vs 31.7% RR 1.3 IC 1.07-1.57, p= 0.0009)

ANEXO VI CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA
HOSPITAL CENTRAL “DR. IGNACIO MORONES PRIETO”**

San Luis Potosí, S.L.P. A _____
Al firmar este documento yo
_____ doy mi consentimiento

voluntario para que mi hijo(a) _____ participen en el proyecto de investigación titulado **“Comparación de las concentraciones séricas del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial posterior a la aplicación intravítrea de Bevacizumab o Ranibizumab como tratamiento de la Retinopatía del Prematuro tipo 1.”** a cargo de **Ada Gabriela Hernández Gámez**, cuyo objetivo es **Conocer las concentraciones del factor de crecimiento vascular endotelial posteriores a la aplicación del tratamiento de la Retinopatía del Prematuro en sangre (Becavizumab/Ranibizumab)**. En este proyecto se le aplicará de forma al azar cualquiera de los 2 medicamentos a su hijo/a como tratamiento para la Retinopatía del prematuro, lo que significa que su hijo/a tiene la misma probabilidad de recibir Bevacizumab ó Ranibizumab, ambos medicamentos tienen la misma efectividad. Posteriormente se tomarán una serie de muestras de sangre para valorar si el medicamento tiene algún efecto en el resto del organismo, midiendo un factor sobre el cual actúa.

Procedimientos: Este estudio se llevará a cabo durante el año 2017 en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. La finalidad es reclutar a 20 pacientes con características similares. El tiempo de participación será de máximo 2 meses. El procedimiento que se llevará a cabo será una toma de muestra de sangre previa a la aplicación de cualquiera de los 2 medicamentos, así como posteriormente en los días 1, 15 y 60 posteriores al tratamiento. Estas muestras serán analizadas sin significar un costo para usted. Además se tomarán datos del expediente de su hijo/a.

Riesgos potenciales y /o molestias previstas:

Existen riesgos mínimos durante la participación de su hijo en el estudio, ya que se tomarán muestras de sangre, donde puede presentar dolor leve y posteriormente puede aparecer un pequeño moretón en el sitio de la punción, el cual desaparecerá por si solo después de 3-4 días. Todo el material que se utilizará para la obtención de la muestra será nuevo y desechable, y esta se realizará por personal completamente capacitado. En el caso de que ocurriera algún daño como consecuencia de la punción podrá usted comunicarse con la investigadora principal para que le proporcione las medidas necesarias a tomar. Además existe un pequeño porcentaje de pacientes en los cuales el medicamento no es efectivo, por lo que tendrá que considerarse la aplicación de una nueva dosis de medicamento ó la aplicación de láser, por lo que su hijo/a será monitorizado de forma muy cercana.

Beneficios:

Ni usted ni su hijo recibirán un beneficio económico directo al ser parte del estudio, sin embargo, será un valioso colaborador del departamento de Oftalmología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” con el objetivo de identificar el mejor tratamiento para los pacientes prematuros con ROP.

Participación o retiro:

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria y su hijo/a ha sido seleccionado/a aleatoriamente. Usted está en la libertad de negarse a participar y en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puede revocar el consentimiento que ahora firma. Su decisión de participar o no, no afectará de ninguna forma el trato que reciba en la Institución, así como el tratamiento que amerite.

Confidencialidad: Todos los datos obtenidos de este proyecto serán confidenciales, es decir serán utilizados únicamente por el equipo de trabajo de este proyecto. Entiendo que cualquier información que se obtenga en este estudio será confidencial y que ni mi nombre ni el de mi hijo (a) serán mencionados en el reporte del estudio. En todo momento su identidad, registros e información serán confidenciales aun cuando los resultados del estudio se publiquen.

Disponibilidad de la información: Usted recibirá toda la información pertinente y relevante acerca del desarrollo de este estudio.

Costos para el paciente/reembolso de gastos:

Los procedimientos que se realicen, el análisis de las muestras de sangre y los tratamientos utilizados en esta investigación, no supondrán ningún costo para usted.

Datos de Contacto: En caso de que exista alguna duda o aclaraciones relacionadas con el estudio puede comunicarse con la investigadora responsable del proyecto:

-Ada Gabriela Hernández Gámez Departamento de Epidemiología Clínica. Facultad de Medicina U.A.S.L.P. Av. Venustiano Carranza 2405, Col Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., C.P.78290, Tel (444) 8 262300 Ext 6688. Celular 44-41-84-10-07.

-Dra Martha Giselda Rangel Charqueño Departamento de Oftalmología Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. Av. Venustiano Carranza 2395, Col Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., C.P.78290, Tel (444) 8 34 27 01 Ext 1612.

Si está de acuerdo con que su hijo participe en este estudio le pedimos su firma, así como la de un testigo para que avale que le fue correctamente explicado en que consiste este proyecto.

Autorizo al personal de salud de esta institución para que como parte de mi diagnóstico y/o tratamiento realicen el procedimiento_____.

Ada Gabriela Hernández Gámez quien obtiene el consentimiento.

Cédula Profesional 7543298

Cédula Especialidad 10048224 _____

Nombre y firma del paciente, familiar o su representante legal_____

Parentesco:

Domicilio:

Nombre _____ y _____ firma _____ de
testigo _____

Parentesco: _____

Domicilio: _____

Nombre _____ y _____ firma _____ de
testigo _____

Parentesco: _____

Domicilio: _____

San Luis Potosí, S.L.P., a _____ de _____ del
_____.

Este estudio fue aprobado por los Comités de Investigación y de Ética en Investigación del Hospital Central Dr. "Ignacio Morones Prieto" con el número de registro **31-17** Para cualquier duda puede llamar al 8-34-27-01-ext 1710, con el Dr. Josué Sidonio Rodríguez Cuevas, presidente del Comité de Ética en Investigación.

ANEXO VII AVISO DE PRIVACIDAD

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA
HOSPITAL CENTRAL “DR. IGNACIO MORONES PRIETO”**

AVISO DE PRIVACIDAD

Aviso de Privacidad: Documento físico, electrónico o en cualquier otro formato generado por el responsable que es puesto a disposición del titular, previo al tratamiento de sus datos personales, de conformidad con el artículo 15 de la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares. “El responsable en este caso es el investigador (a) responsable y el Titular el (la) participante”.

Título del Proyecto: **Concentraciones séricas del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial posterior a la aplicación intravítrea de Bevacizumab o Ranibizumab como tratamiento de la Retinopatía del Prematuro tipo 1.**

Número de registro:

Investigadora responsable

Nombre: Ada Gabriela Hernández Gámez

Dirección: Facultad de Medicina U.A.S.L.P. Av Venustiano Carranza #2405 Col. Los Filtros

Teléfono: 44-41-84-10-07

Correo electrónico: gaby.hdez@alumnos.uaslp.edu.mx

Tipo de información que se solicitará:

Su información personal será obtenida con la finalidad de realizar un estudio de investigación, para lo que es necesario obtener los siguientes datos: Nombre del paciente, nombre del padre/madre/tutor, dirección de los mismos, teléfono, así como datos que se consideran sensibles según a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, tales como: Semanas de gestación y peso al nacer, complicaciones presentadas al nacer, peso actual, edad actual.

Es de importancia recordarle que todo el equipo de investigación que colabora en el presente estudio, se compromete a que todos los datos proporcionados por ud. u obtenidos de su expediente serán tratados bajo medidas de seguridad y garantizando siempre su confidencialidad.

Usted se encuentra bajo la completa libertad de acceder, rectificar y cancelar sus datos personales, así como de oponerse al manejo de los mismos o anular el consentimiento que haya firmado para tal fin, presentando una carta escrita dirigida a la investigadora principal: Ada Gabriela Hernández Gámez, ubicada en Av. Venustiano Carranza # 2405, en el departamento de Epidemiología clínica, Teléfono: 44-41-841007, correo electrónico gaby.hdez@alumnos.uaslp.edu.mx

Existe la posibilidad de que la información de sus datos personales pueda ser compartida y manejada por personas distintas a esta institución. En ese caso se compartiría con la finalidad de dar a conocer al resto de los médicos el

conocimiento obtenido en esta investigación mediante la publicación en una Revista de divulgación científica que puede ser nacional o extranjera.

Si usted no manifiesta oposición para que sus datos personales sean compartidos con los fines mencionados, se entenderá que ha otorgado su consentimiento para ello.

En caso de no estar de acuerdo favor de manifestarlo a continuación, señalando en el apartado correspondiente

_____ No consiento que mis datos personales o los de mi hijo sean transferidos en los términos que señala el presente aviso de privacidad.

Nombre y firma del padre/madre/tutor:

Fecha

ANEXO VIII TABLA DE ALEATORIZACIÓN POR GRUPOS

TABLA DE ALEATORIZACION TESIS

Ada Gabriela Hernández Gámez

6/4/2017

```
set.seed(1)
muestra20 <- sample(1:20,20, replace=F)
tratamiento <- muestra20[1:10]
control <- muestra20[11:20]
sort(tratamiento)
```

```
## [1] 1 4 6 8 9 11 14 15 16 19
```

```
sort(control)
```

```
## [1] 2 3 5 7 10 12 13 17 18 20
```

ANEXO IX CARTA DE AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL CENTRAL IGNACIO MORONES PRIETO



HOSPITAL CENTRAL
"DR. IGNACIO
MORONES PRIETO"

San Luis Potosí, S.L.P. a 30 de marzo de 2017

Dra. Ada Gabriela Hernández Gámez
Investigador Principal:

Por este medio se le comunica que su protocolo de investigación titulado "**Comparación de las Concentraciones séricas del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial posterior a la aplicación intravítrea de Bevacizumab vs Ranibizumab como tratamiento de la Retinopatía del Prematuro tipo 1**", fue evaluado por el Comité de Investigación, con Registro en COFEPRIS 14 CI 24 028 083, así como por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución con Registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427, y fue dictaminado como:

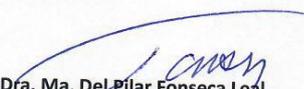
APROBADO

El número de registro es **31-17**, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a ambos comités.

De igual forma pido sea tan amable de comunicar a los Comités de Investigación y de Ética en Investigación: la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe final pertinente.

*Se le recuerda que todos los pacientes que participen en el estudio deben firmar la versión sellada del formato de consentimiento informado.

Atentamente


Dra. Ma. Del Pilar Fonseca Leal
Sub-Directora de Educación e Investigación en Salud
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"



C.C.P. Archivo

Av. Venustiano Carranza No. 2395
Zona Universitaria
San Luis Potosí, S.L.P. C.P. 78290
Tel. 01 (444) 198-10-00
www.hospitalcentral.gob.mx

ANEXO X: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

VEGF

Análisis estadístico del proyecto Concentraciones de VEGF posterior a la aplicación de antiangiogénicos en pacientes con ROP.

Estadísticas descriptivas

```
rani <- read.csv("VEGF1.csv")
```

```
library(car)
```

```
library(gmodels)
```

```
library(ggplot2)
```

Análisis con imputaciones

Hay datos faltantes, se realizó un análisis con imputaciones

```
library(mice)
```

```
imp <- mice(rani, seed=1)
```

```
iter imp variable
  1  1  C2  C3  P2  P3  E3
  1  2  C2  C3  P2  P3  E3
  1  3  C2  C3  P2  P3  E3
  1  4  C2  C3  P2  P3  E3
  1  5  C2  C3  P2  P3  E3
  2  1  C2  C3  P2  P3  E3
  2  2  C2  C3  P2  P3  E3
  2  3  C2  C3  P2  P3  E3
  2  4  C2  C3  P2  P3  E3
  2  5  C2  C3  P2  P3  E3
  3  1  C2  C3  P2  P3  E3
  3  2  C2  C3  P2  P3  E3
  3  3  C2  C3  P2  P3  E3
  3  4  C2  C3  P2  P3  E3
  3  5  C2  C3  P2  P3  E3
  4  1  C2  C3  P2  P3  E3
  4  2  C2  C3  P2  P3  E3
  4  3  C2  C3  P2  P3  E3
  4  4  C2  C3  P2  P3  E3
  4  5  C2  C3  P2  P3  E3
  5  1  C2  C3  P2  P3  E3
  5  2  C2  C3  P2  P3  E3
  5  3  C2  C3  P2  P3  E3
  5  4  C2  C3  P2  P3  E3
  5  5  C2  C3  P2  P3  E3
```

```
ranic <- complete(imp)
```

```
summary(ranic)
```

PAC	SEXO	PESO.N	SDGN	ZONA
Min.: 1.00	F: 6	Min. : 740	Min. :26.00	Min. :1.000
1stQu:4.75	M:10	1st Qu:1042	1st Qu:28.00	1st Qu:1.000
Median : 8.50		Median :1258	Median :29.50	Median :1.000
Mean : 8.50		Mean :1272	Mean :30.41	Mean :1.125
3rd Qu.:12.25		3rd Qu.:1492	3rd Qu.:33.00	3rd Qu.:1.000
Max. :16.00		Max. :2100	Max. :35.50	Max. :2.000
PLUS	ESTADIO.ROP	EDADDX	TX	C0
N: 4	Min:3	Min:28.00	Bevacizumab:9	Min: 14.00
S:12	1st Qu.:3	1st Qu:37.25	Ranibizumab:7	1st Qu:46.12
	Median:3	Median :48.00		Median :111.00
	Mean :3	Mean:48.69		Mean:114.44
	3rd Qu.:3	3rd Qu.:53.00		3rd Qu.:143.88
	Max:3	Max.:76.00		Max:361.00

C1	C2	C3	P0
Min:0.160	Min: 0.16	Min: 0.160	Min :1660
1st Qu:5.875	1st Qu:4.75	1st Qu:1.165	1st Qu:1839
Median:12.250	Median:12.50	Median:27.750	Median :2120
Mean:37.301	Mean:45.58	Mean:57.290	Mean:2211
3rd Qu:38.875	3rd Qu:57.88	3rd Qu:42.000	3rd Qu:2492
Max:260.000	Max:235.50	Max:492.500	Max:3200

P1	P2	P3	E0
Min:1660	Min:1830	Min:2500	Min:28.00
1st Qu:1871	1st Qu:2299	1st Qu:2875	1st Qu:38.00
Median:2120	Median:2715	Median:3500	Median:48.00
Mean:2226	Mean:2631	Mean:3294	Mean:49.38
3rd Qu.:2492	3rd Qu.:2970	3rd Qu.:3600	3rd Qu.:55.25
Max. :3200	Max. :3500	Max. :4700	Max. :76.00

E1	E2	E3
Min. :29.00	Min. :42.00	Min. : 84.0
1st Qu.:39.00	1st Qu.:52.00	1st Qu.: 96.5
Median :49.50	Median :64.00	Median :106.5
Mean :50.44	Mean :63.81	Mean :108.1
3rd Qu.:56.25	3rd Qu.:69.50	3rd Qu.:115.5
Max. :78.00	Max. :90.00	Max. :132.0

Porcs2(ranic)

dat	level1	level2	nlev1	porc1	nlev2	porc2
1 SEXO	F	M	6	37.5	10	62.5
2 PLUS	N	S	4	25	12	75
3 TX Bevacizumab	Ranibizumab		9	56.2	7	43.8

SDStats(ranic)

	n	Media	DE	Mediana	IQR	Min	Max
PAC	16	8.500	4.761	8.50	7.500	1.00	16.0
PESO.N	16	1272.500	354.128	1257.50	450.000	740.00	2100.0
SDGN	16	30.413	2.673	29.50	5.000	26.00	35.5
ZONA	16	1.125	0.342	1.00	0.000	1.00	2.0
ESTADIO.ROP	16	3.000	0.000	3.00	0.000	3.00	3.0
EDADDX	16	48.688	14.867	48.00	15.750	28.00	76.0
C0	16	114.438	92.478	111.00	97.750	14.00	361.0
C1	16	37.301	64.753	12.25	33.000	0.16	260.0
C2	16	45.583	63.207	12.50	53.125	0.16	235.5
C3	16	57.290	120.162	27.75	40.835	0.16	492.5
P0	16	2211.250	453.992	2120.00	653.750	1660.00	3200.0
P1	16	2225.625	443.955	2120.00	621.250	1660.00	3200.0
P2	16	2630.938	474.616	2715.00	671.250	1830.00	3500.0
P3	16	3293.750	599.409	3500.00	725.000	2500.00	4700.0
E0	16	49.375	15.279	48.00	17.250	28.00	76.0
E1	16	50.438	15.466	49.50	17.250	29.00	78.0
E2	16	63.812	15.493	64.00	17.500	42.00	90.0
E3	16	108.062	14.489	106.50	19.000	84.00	132.0

shapiro.test(ranic\$PESO.N)

Shapiro-Wilk normality test

data: ranic\$PESO.N
W = 0.94986, p-value = 0.4875

shapiro.test(ranic\$EDADDX)

Shapiro-Wilk normality test

data: ranic\$EDADDX
W = 0.91491, p-value = 0.1397

shapiro.test(ranic\$SDGN)

Shapiro-Wilk normality test

```
data: ranic$SDGN
W = 0.9211, p-value = 0.1757
shapiro.test(ranic$P0)
  Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: ranic$P0
W = 0.9165, p-value = 0.1482
```

Analisis bivariado

```
by(ranic$SDGN, ranic$TX, shapiro.test)
ranic$TX: Bevacizumab
```

```
  Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: dd[x, ]
W = 0.91492, p-value = 0.3518
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
```

```
  Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: dd[x, ]
W = 0.88398, p-value = 0.2447
```

```
by(ranic$SDGN, ranic$TX, summary)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
 26.00  28.00   29.00   30.28  33.00   35.50
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
 28.00  29.00   30.00   30.59  32.50   33.10
```

```
by(ranic$SDGN, ranic$TX, sd)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
[1] 3.173239
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
[1] 2.089999
```

```
t.test(ranic$SDGN~ranic$TX, paired=F, var.equal=F)
```

```
Welch Two Sample t-test
```

```
data: ranic$SDGN by ranic$TX
t = -0.23326, df = 13.721, p-value = 0.819
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval: -3.144818  2.528945
sample estimates:
mean in group Bevacizumab mean in group Ranibizumab
                30.27778                30.58571
```

```
by(ranic$PESO.N, ranic$TX, shapiro.test)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
```

```
  Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: dd[x, ]
W = 0.96387, p-value = 0.8378
```

```
-----
```

```

ranic$TX: Ranibizumab

Shapiro-Wilk normality test

data: dd[x, ]
W = 0.93678, p-value = 0.6099
by(ranic$PESO.N, ranic$TX, summary)
ranic$TX: Bevacizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
  740   1060   1395   1313   1500   2100
-----
ranic$TX: Ranibizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
  825   1045   1100   1220   1455   1615
by(ranic$PESO.N, ranic$TX, sd)
ranic$TX: Bevacizumab
[1] 409.2905
-----
ranic$TX: Ranibizumab
[1] 290.5885
t.test(ranic$PESO.N~ranic$TX, paired=F, var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: ranic$PESO.N by ranic$TX
t = 0.53289, df = 13.929, p-value = 0.6025
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval: -282.4982  469.1649
sample estimates:
mean in group Bevacizumab mean in group Ranibizumab
          1313.333                1220.000
by(ranic$P0, ranic$TX, shapiro.test)
ranic$TX: Bevacizumab
Shapiro-Wilk normality test
data: dd[x, ]
W = 0.87812, p-value = 0.15
-----
ranic$TX: Ranibizumab
Shapiro-Wilk normality test
data: dd[x, ]
W = 0.94092, p-value = 0.647
by(ranic$P0, ranic$TX, summary)
ranic$TX: Bevacizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
 1660   1850   1900   2233   2500   3200
-----
ranic$TX: Ranibizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
 1750   1902   2240   2183   2425   2635
by(ranic$P0, ranic$TX, sd)
ranic$TX: Bevacizumab
[1] 545.9625
-----
ranic$TX: Ranibizumab
[1] 340.8306
t.test(ranic$P0~ranic$TX, paired=F, var.equal=F)
Welch Two Sample t-test
data: ranic$P0 by ranic$TX
t = 0.22638, df = 13.505, p-value = 0.8243
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

```

95 percent confidence interval:-429.3920 530.3443
 sample estimates:
 mean in group Bevacizumab mean in group Ranibizumab
 2233.333 2182.857

by(ranic\$EDADDX, ranic\$TX, shapiro.test)

ranic\$TX: Bevacizumab
 Shapiro-Wilk normality test
 data: dd[x,]
 W = 0.87758, p-value = 0.148

 ranic\$TX: Ranibizumab
 Shapiro-Wilk normality test
 data: dd[x,]
 W = 0.86642, p-value = 0.1726

by(ranic\$EDADDX, ranic\$TX, summary)

ranic\$TX: Bevacizumab
 Min. 1st Qu. Median Mean 3rd Qu. Max.
 33.00 46.00 50.00 49.56 52.00 75.00

 ranic\$TX: Ranibizumab
 Min. 1st Qu. Median Mean 3rd Qu. Max.
 28.00 33.50 38.00 47.57 62.00 76.00

by(ranic\$EDADDX, ranic\$TX, sd)

ranic\$TX: Bevacizumab
 [1] 11.392

 ranic\$TX: Ranibizumab
 [1] 19.41526

t.test(ranic\$EDADDX~ranic\$TX, paired=F, var.equal=F)

Welch Two Sample t-test
 data: ranic\$EDADDX by ranic\$TX
 t = 0.24013, df = 9.1514, p-value = 0.8155
 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
 95 percent confidence interval:-16.66009 20.62834
 sample estimates:

mean in group Bevacizumab mean in group Ranibizumab
 49.55556 47.57143

CrossTable(ranic\$SEXO, ranic\$TX, fisher=T, chisq=T, expected=T, prop.c=T, prop.t=T, prop.chisq=F, sresid=T, format="SPSS")

Cell Contents

		ranic\$TX		
		Bevacizumab	Ranibizumab	Row Total
F	Count	5	1	6
	Expected Values	3.375	2.625	
	Row Percent	83.333%	16.667%	37.500%
	Column Percent	55.556%	14.286%	
	Total Percent	31.250%	6.250%	
Std Residual		0.885	-1.003	

Total Observations in Table: 16

M	4	6	10
	5.625	4.375	
	40.000%	60.000%	62.500%
	44.444%	85.714%	
	25.000%	37.500%	
	-0.685	0.777	
Column Total	9	7	16
	56.250%	43.750%	

Statistics for All Table Factors

Pearson's Chi-squared test

Chi^2 = 2.861376 d.f. = 1 p = 0.09072987
 Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction

Chi^2 = 1.371429 d.f. = 1 p = 0.2415666
 Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 6.573833
 Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
 p = 0.1451049
 95% confidence interval: 0.4663642 411.221
 Alternative hypothesis: true odds ratio is less than 1
 p = 0.9895105
 95% confidence interval: 0 202.4763
 Alternative hypothesis: true odds ratio is greater than 1
 p = 0.1206294
 95% confidence interval: 0.6324132 Inf
 Minimum expected frequency: 2.625
 Cells with Expected Frequency < 5: 3 of 4 (75%)

Normalidad de las concentraciones y comparación entre grupos

by(ranic\$C0, ranic\$TX, shapiro.test)

ranic\$TX: Bevacizumab
 Shapiro-Wilk normality test
 data: dd[x,]
 W = 0.81581, p-value = 0.0309

ranic\$TX: Ranibizumab
 Shapiro-Wilk normality test
 data: dd[x,]
 W = 0.69396, p-value = 0.003184

by(ranic\$C0, ranic\$TX, summary)

ranic\$TX: Bevacizumab

Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
14.00	19.50	53.50	80.44	131.00	240.50

ranic\$TX: Ranibizumab

Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
92.0	111.0	133.5	158.1	149.2	361.0

by(ranic\$C0, ranic\$TX, IQR)

ranic\$TX: Bevacizumab
 [1] 111.5

ranic\$TX: Ranibizumab
 [1] 38.25

by(ranic\$C1, ranic\$TX, shapiro.test)

```
ranic$TX: Bevacizumab
Shapiro-Wilk normality test
data: dd[x, ]
W = 0.69247, p-value = 0.001159
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
Shapiro-Wilk normality test
data: dd[x, ]
W = 0.65647, p-value = 0.001218
```

```
by(ranic$C1, ranic$TX, summary)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
  0.16   2.00   6.00   18.20  20.00   87.00
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
  8.50  12.25  16.00   61.86  62.00  260.00
```

```
by(ranic$C1, ranic$TX, IQR)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
[1] 18
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
[1] 49.75
```

```
by(ranic$C2, ranic$TX, shapiro.test)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
Shapiro-Wilk normality test
data: dd[x, ]
W = 0.61519, p-value = 0.0001442
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
Shapiro-Wilk normality test
data: dd[x, ]
W = 0.88283, p-value = 0.2393
```

```
by(ranic$C2, ranic$TX, summary)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
  0.16   4.00   5.00   9.48   6.50   47.00
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
  Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
 12.50  52.25  74.00   92.00 108.75  235.50
```

```
by(ranic$C2, ranic$TX, IQR)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
[1] 2.5
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
[1] 56.5
```

```
by(ranic$C3, ranic$TX, shapiro.test)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
Shapiro-Wilk normality test
data: dd[x, ]
W = 0.77077, p-value = 0.009427
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
Shapiro-Wilk normality test
data: dd[x, ]
W = 0.5622, p-value = 9.654e-05
```

```
by(ranic$C3, ranic$TX, summary)
```

```
ranic$TX: Bevacizumab
Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
```

```
0.16    1.50    16.00    29.37    28.00    119.50
```

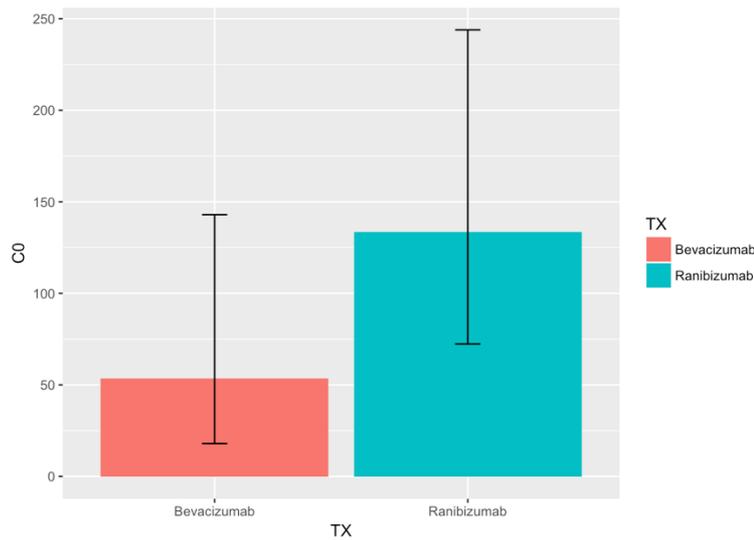
```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.
0.16  14.08   36.50   93.19  47.50  492.50
```

```
by(ranic$C3, ranic$TX, IQR)
```

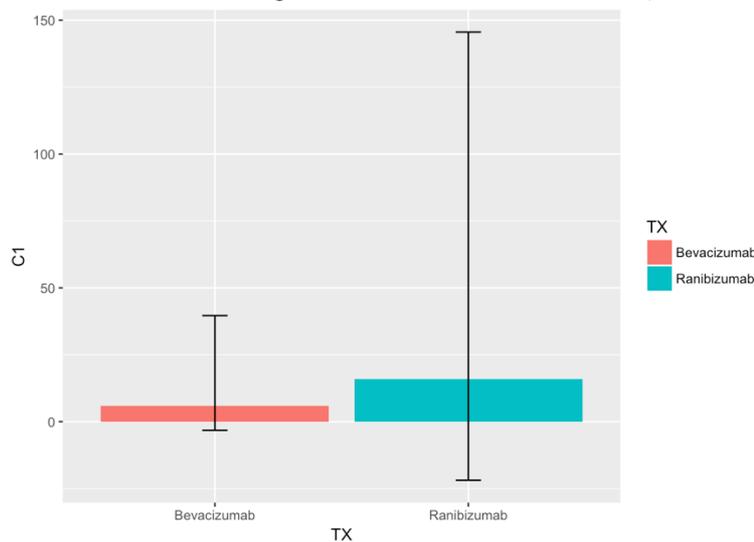
```
ranic$TX: Bevacizumab
[1] 26.5
```

```
-----
ranic$TX: Ranibizumab
[1] 33.42
```

```
graph <- ggplot(ranic, aes(TX, C0))
graph + stat_summary(fun.y=median, geom="bar", aes(fill = TX))
+stat_summary(fun.data=
mean_cl_normal, geom="errorbar", width=0.1)
```

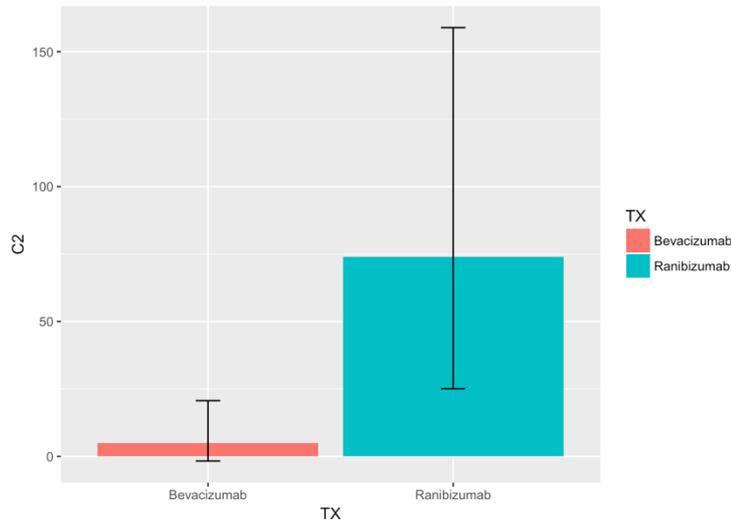


```
graph2 <- ggplot(ranic, aes(TX, C1))
graph2 + stat_summary(fun.y=median, geom="bar", aes(fill = TX))
+stat_summary(fun.data
=mean_cl_normal, geom="errorbar", width=0.1)
```



```
graph3 <- ggplot(ranic,
aes(TX, C2))
graph3 + stat_summary(fun.y=median, geom="bar", aes(fill = TX))
+stat_summary(fun.data
```

```
=mean_cl_normal, geom="errorbar", width=0.1)
```



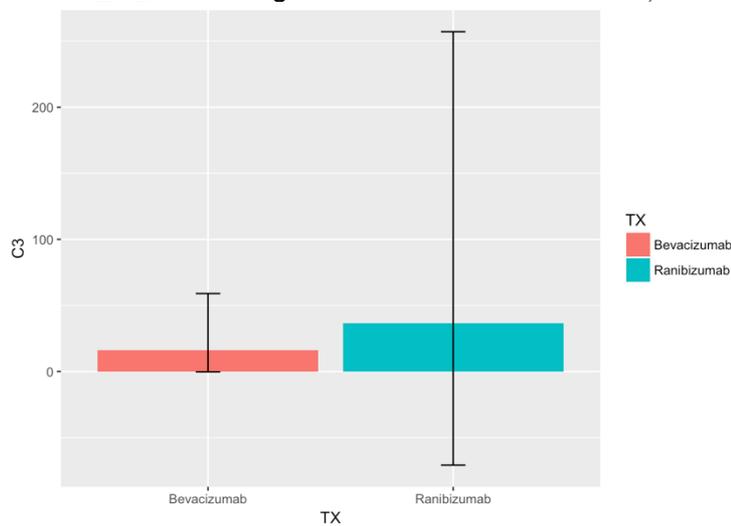
```
graph4 <- ggplot(ranic,
```

```
aes(TX, C3))
```

```
graph4 + stat_summary(fun.y=median, geom="bar", aes(fill = TX))
```

```
+stat_summary(fun.data
```

```
=mean_cl_normal, geom="errorbar", width=0.1)
```



```
wilcox.test(ranic$C0~ranic$TX)
```

```
Wilcoxon rank sum test
```

```
data: ranic$C0 by ranic$TX
```

```
W = 15, p-value = 0.09073
```

```
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

```
wilcox.test(ranic$C1~ranic$TX) Warning in wilcox.test.default(x = c(0.16, 2, 32.5, 20, 6, 10.5, 0.16,87, : cannot compute exact p-value with ties
```

```
Wilcoxon rank sum test with continuity correction
```

```
data: ranic$C1 by ranic$TX
```

```
W = 15, p-value = 0.0901
```

```
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

```
wilcox.test(ranic$C2~ranic$TX)
```

```
Warning in wilcox.test.default(x = c(5, 6, 6.5, 4, 12.5, 4, 0.16, 47, 0.16:cannot compute exact p-value with ties
```

```
Wilcoxon rank sum test with continuity correction
```

```
data: ranic$C2 by ranic$TX
```

```
W = 1.5, p-value = 0.001751
```

```
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

```
wilcox.test(ranic$C3~ranic$TX)
```

```
Warning in wilcox.test.default(x = c(0.16, 1.5, 16, 13, 28, 58.5, 27.5, :cannot compute exact p-value with ties
```

```
Wilcoxon rank sum test with continuity correction
```

```
data: ranic$C3 by ranic$TX
```

```
W = 24, p-value = 0.4544
```

```
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

Anova de medidas repetidas

Sin logaritmos

```
library(reshape2)
```

```
data2 <- ranic[, c(1, 9:13)]
```

```
ld <- melt(data2, id=c("PAC", "TX"))
```

```
names(ld)[4] <- "Concentracion"
```

```
names(ld)[3] <- "Tiempo"
```

```
ld$PAC <- as.factor(ld$PAC)
```

```
ld <- ld[order(ld$PAC),]
```

```
mod1 <- aov(Concentracion~TX*Tiempo + Error(PAC), data= ld)
```

```
summary(mod1)
```

```
Error: PAC
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TX	1	70540	70540	3.375	0.0875 .
Residuals	14	292634	20902		

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Error: Within
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tiempo	3	58248	19416	8.080	0.000231 ***
TX:Tiempo	3	3585	1195	0.497	0.686182
Residuals	42	100930	2403		

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
ranic$TX[1] <- "Ranibizumab"
```

```
data3 <- ranic[, c(1, 9:13)]
```

```
longdata1 <- melt(data3, id=c("PAC", "TX"))
```

```
names(longdata1)[4] <- "Concentracion"
```

```
names(longdata1)[3] <- "Tiempo"
```

```
longdata1$PAC <- as.factor(longdata1$PAC)
```

```
longdata1 <- longdata1[order(longdata1$PAC),]
```

```
mod1 <- aov(Concentracion~TX*Tiempo + Error(PAC), data= longdata1)
```

```
summary(mod1)
```

```
Error: PAC
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TX	1	42462	42462	1.854	0.195
Residuals	14	320712	22908		

```
Error: Within
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tiempo	3	58248	19416	8.021	0.000244 ***
TX:Tiempo	3	2845	948	0.392	0.759570
Residuals	42	101670	2421		

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
longdata1$TXT <- paste(longdata1$TX, longdata1$Tiempo, sep = "")
```

```
longdata1$TXT <- as.factor(longdata1$TXT)
```

```
pairwise.t.test(longdata1$Concentracion, longdata1$TXT, paired=T,
```

```

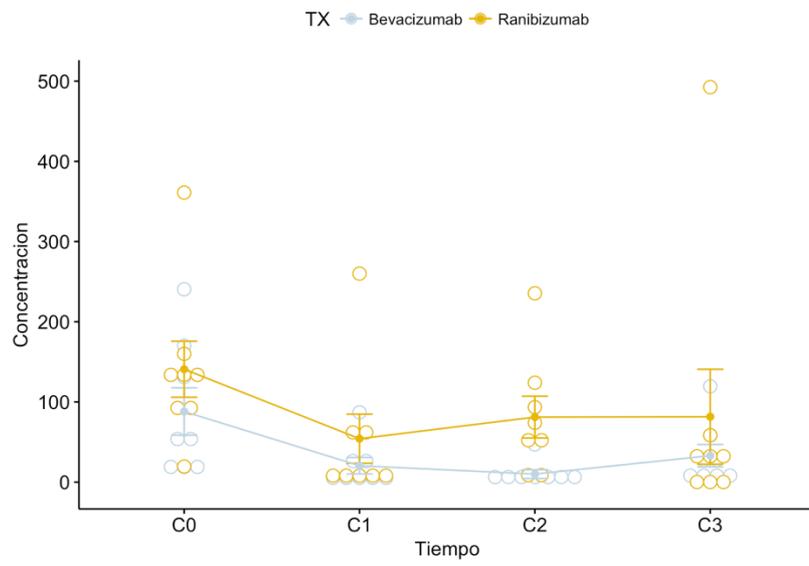
p.adjust.method = "bonferroni" )
Pairwise comparisons using paired t tests
data: longdata1$Concentracion and longdata1$TXT
      BevacizumabC0 BevacizumabC1 BevacizumabC2 BevacizumabC3
BecavizumabC1 1.000          -          -          -
BecavizumabC2 1.000          1.000        -          -
BecavizumabC3 1.000          1.000        1.000        -
RanibizumabC0 1.000          0.299        0.210        0.305
RanibizumabC1 1.000          1.000        1.000        1.000
RanibizumabC2 1.000          1.000        0.744        1.000
RanibizumabC3 1.000          1.000        1.000        1.000
      RanibizumabC0 RanibizumabC1 RanibizumabC2
BecavizumabC1 -          -          -
BecavizumabC2 -          -          -
BecavizumabC3 -          -          -
RanibizumabC0 -          -          -
RanibizumabC1 0.031        -          -
RanibizumabC2 0.133        1.000        -
RanibizumabC3 1.000        1.000        1.000
P value adjustment method: bonferroni

```

```

library("ggpubr")
ggline(longdata1, x = "Tiempo", y = "Concentracion", color = "TX",
       add = c("mean_se", "dotplot"),
       palette = c("#BFD5E3", "#E7B800"))
`stat_bindot()` using `bins = 30`. Pick better value with
`binwidth`.

```



No siguen distribución normal y las varianzas no son homogéneas se convertirán a logaritmos

```

ld$LogConc <- log(ld$Concentracion+0.01)
md2 <- aov(LogConc~TX*Tiempo + Error(PAC), data= ld)
summary(md2)
Error: PAC
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TX      1  40.4   40.40    5.279 0.0375 *
Residuals 14 107.1    7.65
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

Error: Within
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tiempo  3  49.31  16.437   8.024 0.000243 ***
TX:Tiempo 3  14.05   4.682   2.286 0.092651 .
Residuals 42  86.04   2.049
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

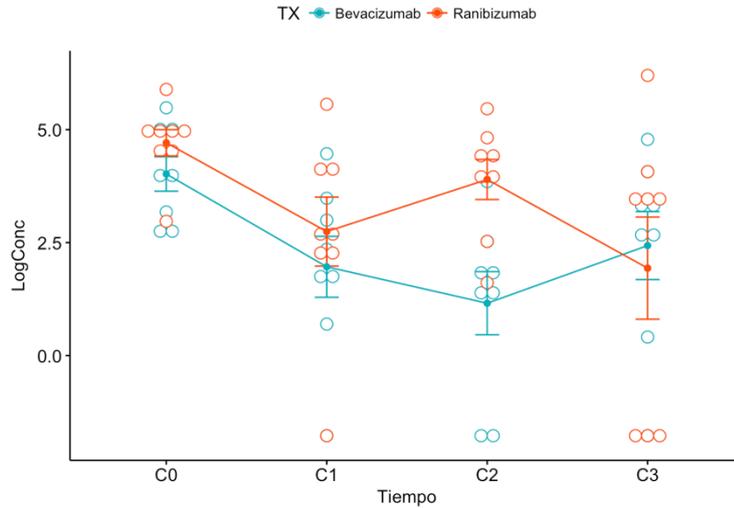
longdata1$LogConc <- log(longdata1$Concentracion+0.01)
mod2 <- aov(LogConc~TX*Tiempo + Error(PAC), data= longdata1)
summary(md2)
Error: PAC
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TX      1  40.4   40.40   5.279 0.0375 *
Residuals 14 107.1    7.65
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Error: Within
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tiempo  3  49.31  16.437   8.024 0.000243 ***
TX:Tiempo 3  14.05   4.682   2.286 0.092651 .
Residuals 42  86.04   2.049
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

longdata1$TXT <- paste(longdata1$TX, longdata1$Tiempo, sep = "")
longdata1$TXT <- as.factor(longdata1$TXT)
pairwise.t.test(longdata1$LogConc, longdata1$TXT, paired=T, p.adjust.method =
"bonferroni" )
  Pairwise comparisons using paired t tests
data: longdata1$LogConc and longdata1$TXT
      BevacizumabC0 BevacizumabC1 BevacizumabC2 BevacizumabC3
B1 0.218          -          -          -
B2 0.166          1.000         -          -
B3 1.000          1.000         1.000         -
R1 1.000          0.077         0.062         0.343
R2 1.000          1.000         1.000         1.000
R3 1.000          0.499         0.154         0.430
R4 1.000          1.000         1.000         1.000
      RanibizumabC0 RanibizumabC1 RanibizumabC2
B1 -          -          -
B2 -          -          -
B3 -          -          -
R1 -          -          -
R2 0.194         -          -
R3 0.411         1.000         -
R4 0.642         1.000         1.000
  P value adjustment method: bonferroni

ggline(longdata1, x = "Tiempo", y = "LogConc", color = "TX",
  add = c("mean_se", "dotplot"),
  palette = c("#00AFBB", "#FC4E07"))
`stat_bindot()` using `bins = 30`. Pick better value with
`binwidth`.

```



ANÁLISIS DEL GRUPO CONTROL

Estadísticas descriptivas

```
cont <- read.csv("CONTROLES.csv")
```

```
str(cont)
```

```
'data.frame': 15 obs. of 10 variables:
 X: int 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ...
 SDG: num 32 34 33 34 33.1 34 32 34 34 32 ...
 PN: int 1250 1460 1600 1980 1400 1500 1200 1520 1530 1500 ...
 S: Factor w/ 2 levels "F", "M": 2 2 2 1 2 2 1 2 1 2 ...
 EDAD: int 42 55 30 125 70 33 29 34 34 53 ...
 CONCENTRACION: num 88.5 1 61 235.5 356 ...
 edad: int 28 29 30 32 33 34 34 42 46 46 ...
 sdg: num 32 32 32 32 33 33 33.1 34 34 34 ...
```

```
source("funciones.R")
```

```
SDStats(cont)
```

	n	Media	DE	Mediana	IQR	Min	Max
X.	15	8.000	4.472	8	7.00	1.00	15
SDG	15	33.473	1.300	34	1.50	32.00	37
PN	15	1610.000	302.726	1520	400.00	1200.00	2240
EDAD	15	48.667	25.505	42	21.50	28.00	125
CONCENTRACION	15	96.644	107.320	61	137.25	0.16	356
edad	15	48.667	25.505	42	21.50	28.00	125
sdg	15	33.473	1.300	34	1.50	32.00	37

```
Porcs2(cont)
```

dat	level1	level2	nlev1	porc1	nlev2	porc2	
1	S	F	M	4	26.7	11	73.3

Análisis Bivariado

```
library(car)
```

```
library(gmodels)
```

```
shapiro.test(cont$CONCENTRACION)
```

```
Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: cont$CONCENTRACION
```

```
W = 0.85113, p-value = 0.01802
```

```
shapiro.test(cont$SDG)
```

```
Shapiro-Wilk normality test
```

```

data: cont$SDG
W = 0.80865, p-value = 0.004757
shapiro.test(cont$PN)
Shapiro-Wilk normality test
data: cont$PN
W = 0.93411, p-value = 0.314
shapiro.test(cont$EDAD)
Shapiro-Wilk normality test
data: cont$EDAD
W = 0.75791, p-value = 0.001113
summary(cont)
      X.          SDG          PN          S          EDAD
Min: 1.0      Min:32.00      Min:1200      F: 4      Min: 28.00
1st Qu.:4.5    1st Qu.:32.50      1st Qu.:1430      M:11      1st Qu: 32.50
Median:8.0     Median:34.00      Median:1520
Mean: 8.0      Mean:33.47        Mean:1610
3rd Qu.:11.5   3rd Qu.:34.00      3rd Qu.:1830
Max:15.0       Max:37.00         Max:2240
CONCENTRACION      edad
Min.   : 0.16        Min: 28.00
1st Qu.: 8.25        1st Qu: 32.50
Median : 61.00        Median: 42.00
Mean   : 96.64        Mean: 48.67
3rd Qu.:145.50      3rd Qu: 54.00
Max.   :356.00       Max:125.00
      sdg
Min.   :32.00
1st Qu.:32.50
Median :34.00
Mean   :33.47
3rd Qu.:34.00
Max.   :37.00
IQR(cont$SDG)
[1] 1.5
IQR(cont$CONCENTRACION)
[1] 137.25
sd(cont$PN)
[1] 302.7257
sd(cont$EDAD)
[1] 25.50537

```

Gráfica de edades con concentraciones

Ahora haré una gráfica de correlación entre las concentraciones y las edades

```

library(car)
library(mada)
correlacion <- cor.test(cont$EDAD, cont$CONCENTRACION, method=
"spearman")
correlacion
Spearman's rank correlation rho
data: cont$EDAD and cont$CONCENTRACION
S = 361.47, p-value = 0.1948
alternative hypothesis: true rho is not equal to 0
sample estimates:
      rho
0.3545212
CIrho(correlacion$estimate, 15, level = 0.95)
      rho      2.5 %      97.5 %

```

```
[1,] 0.3545212 -0.1927459 0.7335631
```

```
library(ggplot2)  
graph <- ggplot(cont, aes(EDAD, CONCENTRACION))  
graph + geom_point() + geom_smooth(method=lm)
```

