



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y  
DE LA SALUD

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

***NIVELES SÉRICOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL  
VASCULAR (VEGF) Y FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO  
(PIGF) EN NEONATOS PRETÉRMINO Y SU RELACIÓN CON EL  
DESARROLLO DE RETINOPATÍA DEL PREMATURO***

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

Presenta:

**Dra. Zaira del Carmen Bernal Díaz**

Tutor:

**Dr. Miguel Ángel Villasis Keever**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**CDMX, Marzo 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>6</b>
FISIOPATOLOGIA DE ROP.....	7
CRITERIOS PARA TAMIZAJE DE ROP.....	8
ESTADIFICACIÓN DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO .....	8
<i>Enfermedad Preumbral</i> .....	9
<i>ROP Preumbral tipo I:</i> .....	9
<i>ROP Preumbral tipo II:</i> .....	9
FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF).....	11
<i>Donde podemos medir VEGF?</i> .....	11
<i>VEGF en distintos órganos</i> .....	12
<i>VEGF en Retinopatía Inducida por Oxígeno</i> .....	13
<i>VEGF sérico en prematuros con ROP</i> .....	14
FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PLGF).....	16
<i>PIGF en distintos órganos</i> .....	16
LA RETINA COMO BARRERA .....	17
TRATAMIENTO EN ROP.....	18
PUNTAJE SNAP-PE II.....	19
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>21</b>
<b>PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	24
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	24
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	25
VARIABLES A ESTUDIAR (VER ANEXO II).....	25
<i>Variables Dependientes</i> .....	25
<i>Variables Independientes</i> .....	25
MEDICIONES .....	26
CÁLCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA .....	27
PROCEDIMIENTO .....	28
<i>Estrategias para el reclutamiento de pacientes</i> .....	28
<i>Revisión de Fondo de Ojo para detección de ROP</i> .....	29
<i>Escala SNAP-PE II</i> .....	29
<i>Transporte, Almacenamiento y Procesamiento de Muestras</i> .....	30
<b>PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>31</b>
<b>CONSIDERACIONES ÉTICAS</b> .....	<b>32</b>
RIESGO DE LA INVESTIGACIÓN .....	32

CONFIDENCIALIDAD .....	32
RESPONSABILIDAD MÉDICA .....	33
<b>CONSIDERACIONES BIOSEGURIDAD .....</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>38</b>
<i>FIGURA 1. Selección de población de estudio .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 1. Características demográficas de la población.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 2. Análisis de comportamiento sérico de proteínas.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3. Factores relacionados con VEGF y PlGF al mes de vida. Análisis de regresión lineal.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 2. Concentraciones séricas de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF).....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 3. Concentraciones séricas de Factor de Crecimiento Placentario (PlGF).....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 4. Correlación entre Factor de Crecimiento Endotelial Vascular en la semana 1 y las Semanas de Gestación al nacimiento por Grupos.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 5. Correlación entre Factor de Crecimiento Placentario en la semana 4 y las Semanas de Gestación al nacimiento por Grupos.....</i>	<i>44</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>50</b>
VARIABLES DEL ESTUDIO.....	50
<b>ANEXO III.....</b>	<b>51</b>
CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	51
<b>ANEXO IV .....</b>	<b>53</b>
HOJAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	53
<b>ANEXO V.....</b>	<b>57</b>
ESCALA SNAPE-PE II .....	57
<b>ANEXO VI.....</b>	<b>58</b>
DOCUMENTOS APROBACIÓN HOSPITALARIA .....	58
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>60</b>

### *NIVELES SÉRICOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) Y FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PIGF) EN NEONATOS PREMATUROS Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE RETINOPATÍA DEL PREMATURO*

#### ***Antecedentes***

En América Latina, la Retinopatía del Prematuro (ROP), es la causa número uno de ceguera infantil. La ROP es una enfermedad multifactorial caracterizada por cese de la vascularización retiniana, formación de neovasos y membranas que pueden terminar en desprendimiento de retina y ceguera. Se han diseñado tratamientos de aplicación intraocular que pueden causar efectos sistémicos indeseables al modificar las concentraciones séricas del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento Placentario (PIGF). Estas proteínas son necesarias para el desarrollo y funcionamiento de órganos vitales como cerebro, riñón y pulmón, en el neonato prematuro. Estudios transversales muestran niveles séricos de VEGF 200 pg/ml más altos en neonatos prematuros con retinopatía que en neonatos sin retinopatía; mientras que otros sugieren un descenso drástico posterior a la aplicación de tratamiento intraocular para ROP. Sin embargo existe poca evidencia que demuestre las modificaciones de dichas proteínas en suero ante diversas condiciones sistémicas propias del prematuro.

#### ***Objetivo***

Comparar los niveles séricos de VEGF y PIGF en neonatos prematuros con y sin retinopatía durante el primer mes de vida, y determinar la influencia de la gravedad sistémica medida por SNAP-PE II (Escala para Fisiología Aguda Neonatal con Extensión Perinatal, por sus siglas en inglés), sobre los cambios en las concentraciones de VEGF y PLGF en prematuros.

#### ***Metodología***

Se realizó un estudio analítico, observacional, prospectivo y longitudinal; donde se incluyeron neonatos nacidos en el Hospital General de México con  $\leq 34$  semanas de gestación (SDG) y/o  $\leq 1750$  gramos de peso al nacimiento. Se realizaron censos diarios de nacimientos entre agosto 2015 y marzo 2016, solicitando consentimiento informado de los padres o tutores y toma de 3 muestras de máximo 1ml de sangre por punción periférica en la semana 1, 2 y 4 de vida; las muestras fueron transportadas en frío, centrifugadas y alicuotadas para su almacenamiento y posterior procesamiento mediante ELISA para medir concentraciones séricas de VEGF y PIGF. Se tomó información del expediente clínico para hacer la medición de la escala de gravedad

SNAP-PE II en esos tres momentos y se realizó la revisión de fondo de ojo al mes de vida para detección oportuna de Retinopatía del Prematuro (ROP).

### **Resultados**

Incluimos un total de 36 sujetos en el análisis, 22 sin ROP y 14 con ROP, tres casos con ROP estadio 3 fueron sometidos a tratamiento. Las concentraciones séricas de VEGF tuvieron un comportamiento distinto en el grupo con ROP con medianas de 518 pg/ml, 936 pg/ml y 689 pg/ml; en la semana 1, 2 y 4 de vida respectivamente; mientras que en el grupo sin retinopatía las medianas fueron: 869 pg/ml, 766 pg/ml y 555 pg/ml; sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Las concentraciones séricas de PIGF fueron incrementándose a través del tiempo en ambos grupos, las medianas en la semana 1 fueron: 12.26 pg/ml para el grupo con ROP y 49.01 pg/ml para el grupo sin ROP ( $p < 0.0001$ ); en la semana 2 de vida: 41.39 pg/ml vs. 65.44 pg/ml ( $p = 0.03$ ) y en la semana 4 de vida: 58.87 pg/ml vs. 77.23 pg/ml ( $p=0.44$ ). El análisis de regresión lineal mostró que el único factor con una contribución significativa para las concentraciones en la semana 4 de vida para VEGF fue la medición de la misma proteína en la semana 2 de vida; mientras que para PIGF los factores más importantes fueron las dos mediciones previas de la proteína. El estadístico de Skillings Mack no demostró diferencias importantes durante las mediciones seriadas de VEGF ( $p=0.06$ ), mientras que para PIGF sí se encontró una diferencia significativa ( $p<0.001$ ).

### **Conclusiones**

Los valores séricos de VEGF no fueron diferentes entre los sujetos que desarrollaron ROP y los que no; mientras que los de PIGF mostraron diferencias significativas en la semana 1 y 2 de vida. Ambas moléculas presentaron una dispersión amplia y solo el PIGF mostró una tendencia permanente al aumento en ambos grupos. La gravedad sistémica de los sujetos medida por SNAP-PE II no afectó las concentraciones séricas de ninguna de las proteínas. En el modelo multivariante para las concentraciones séricas de VEGF en el día 30 el único contribuyente con  $p<0.05$  fue la concentración de VEGF en la semana 2 de vida. Para PIGF las únicas dos variables que afectaron sus concentraciones en el día 30 vida, fueron las mediciones de la misma proteína durante la semana 2 y 4 de vida.

Es importante tomar en cuenta que pueden existir variables modificadoras de VEGF y PIGF en suero no relacionadas con el tratamiento local para ROP, y por lo tanto no es conveniente asegurar que sus modificaciones son el efecto directo de una maniobra terapéutica intraocular en prematuros.

**Palabras Clave:** Retinopatía del Prematuro, VEGF, PIGF, séricos, SNAP-PE II

## ANTECEDENTES

Aproximadamente 1.6 millones, de niños son ciegos o tienen algún compromiso visual severo; 60 mil de estos casos son por retinopatía del prematuro. Por esto la Retinopatía del Prematuro (ROP) es una de las estrategias prioritarias en el proyecto visión 2020 de la Agencia Internacional para la Prevención de la Ceguera.<sup>1</sup>

En America Latina existen, aproximadamente 150 mil ciegos; de los cuales 25 mil son por ROP, colocando a ésta como la causa número uno de ceguera infantil. <sup>1</sup> La Asociación Panamericana de Oftalmología refiere que, en regiones prósperas, el 10% de los niños son ciegos por ROP; mientras que en regiones con ingresos medios se incrementa hasta 25% la discapacidad visual por ésta causa.<sup>2</sup>

La ROP fue detectada como causa de ceguera desde las décadas de los 40s y 50s en países industrializados, ya que la supervivencia de neonatos prematuros aumentó y de igual manera el uso desmedido de oxígeno para su tratamiento.<sup>3</sup> Posteriormente disminuyó drásticamente su incidencia al restringir el uso de oxígeno, sin embargo hubo un incremento en la parálisis cerebral y la mortalidad en los bebés prematuros.<sup>4</sup> Al mejorar el manejo en las unidades de cuidados intensivos se dio lo que se conoce como la “segunda epidemia” de ROP, aumentando de nuevo su incidencia debido a la mayor sobrevivencia de niños cada vez más pequeños e inmaduros. En las últimas décadas este fenómeno se ha presentado en países en vías de desarrollo, dando lugar a la llamada “tercera epidemia” de ROP.

En países industrializados la ROP es una enfermedad prácticamente exclusiva de los niños extremadamente prematuros ( $\leq 1000$  gr.). Pero la información de los países con ingresos medios a bajos indican, que los bebés prematuros con ROP presentan las características de la primera epidemia de ROP; lo cual implica que niños de mayor edad gestacional y mayor peso al nacimiento pueden presentar la enfermedad.<sup>5</sup>

En 2010 Zimmermann y colaboradores realizaron una revisión de la literatura para conocer la prevalencia de ROP en Latinoamérica. Se encontró una prevalencia de la enfermedad en México entre 10 y 28%, la variedad grave de la enfermedad tuvo una prevalencia entre 2.7 y 11.4%; es decir que casi la mitad de los casos diagnosticados con ROP requirieron una intervención oportuna para prevenir ceguera irreversible. Los tamaños muestrales de los 4 trabajos revisados, fueron 29, 55, 88 y 2014 sujetos; pero los criterios de tamizaje estuvieron basados en guías para países de primer mundo; lo cual podría dejar fuera de las revisiones a niños en riesgo; y por lo tanto subestimar la prevalencia de la enfermedad en nuestro país.<sup>6</sup>

La prevalencia de ROP tiene una relación directa con la edad gestacional y el peso al nacimiento, en Turquía Murat y colaboradores realizaron un estudio de cohorte para factores de

riesgo en ROP, con una población total de 650 neonatos prematuros, encontraron que la prevalencia de ROP en los menores de 28 SDG fue de 82%, mientras que en los mayores de esta edad es de 28.6%; y de éstos el 33.9% y el 3.5% respectivamente requirieron tratamiento. En cuanto al peso al nacimiento en su cohorte encontraron que la prevalencia de ROP en menores de 1000 gramos fue de 81.8%; en el grupo con peso al nacimiento entre 1000 y 1500 gramos la ROP se presentó en el 53.9% de los sujetos, mientras que en prematuros con peso mayor a 1500 gramos la prevalencia fue de 16%; la necesidad de tratamiento en estos subgrupos fue de 33.7%, 10.9% y 1.4% respectivamente.<sup>7</sup>

## **FISIOPATOLOGIA DE ROP**

La ROP es una enfermedad vasoproliferativa dinámica que causa una vascularización incompleta de la retina en neonatos prematuros de bajo peso al nacer; se caracteriza por una proliferación fibrovascular en el borde entre la retina vascular y la avascular. Su fisiopatología es compleja y su etiología multifactorial.<sup>1</sup>

En la fisiopatología de la ROP se describen dos fases, la *primera* que suele presentarse entre la semana 22 y 30 de edad postmestrua y está caracterizada por vaso-obliteración la cual es favorecida por un estado de hipoxia, que a su vez provoca disminución en VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) en el ojo; mientras que la segunda, se presenta entre la semana 31 a la 44 y suele ser vasoproliferativa inducida por la hiperoxia consiguiente, y con un aumento de la expresión de VEGF.<sup>8,9</sup> Por esta razón una de las moléculas más estudiadas dentro de la fisiopatología de la ROP es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), al igual que otros factores pro-angiogénicos similares, como el Factor de Crecimiento Placentario (PIGF).

Los niveles de oxígeno han sido reconocidos como un factor de riesgo importante en el desarrollo de la retinopatía del prematuro. En la década de 1940, los altos niveles de oxígeno no regulado al nacer causaron probablemente los primeros casos de la enfermedad. Los modelos animales de retinopatía inducida por oxígeno han podido demostrar que periodos constantes de hiperoxia causan obliteración de los capilares de reciente formación.<sup>10</sup>

El ensayo clínico STOP-ROP (Oxígeno Suplementario Terapéutico para ROP pre-umbral) no encontró beneficios significativos de administrar oxígeno suplementario a bebés con retinopatía pre-umbral. Sin embargo otros estudios clínicos han demostrado, como las fluctuaciones y el incremento del oxígeno, administrado a niños prematuros incrementa el riesgo de retinopatía grave. La reducción de los niveles de oxígeno puede afectar el desarrollo del cerebro en los prematuros y la administración de oxígeno suplementario es común durante los exámenes y procedimientos en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN), el

conocimiento de los efectos específicos del oxígeno suplementario (OS) en ROP es de gran ayuda para comprender mejor la enfermedad.<sup>10</sup>

## **CRITERIOS PARA TAMIZAJE DE ROP**

Los criterios adoptados en países latino-americanos son diversos y dado que la edad gestacional, en muchos casos, es poco confiable; el peso al nacimiento cobra mayor importancia.<sup>11</sup>

La Secretaría de Salud de México ha sugerido criterios para la revisión de recién nacidos prematuros con riesgo de retinopatía. Estos incluyen <sup>12</sup>:

1. Todos los recién nacidos (RN) pretérmino con menos o 34 semanas de edad gestacional y/o menos de 1750g. de peso al nacimiento (PN).
2. RN pretérmino, mayores o igual de 1750 g PN y menor a 34 semanas de gestación que hayan recibido oxígeno suplementario a criterio del médico tratante.
3. RN pretérmino que tengan factores de riesgo asociados a criterio del médico tratante (asistencia respiratoria mecánica, transfusión, hipoxia - hiperoxia, choque, apneas, maniobras de reanimación, acidosis, sepsis, esteroides post-natales, sepsis por Candida, persistencia de conducto arterioso, etc.).

La aparición de los primeros datos de ROP está directamente relacionado con la edad corregida, por lo tanto las revisiones a bebés en riesgo deben programarse dependiendo de ésta; para los niños nacidos antes de las 27 SDG, la primera revisión oftalmológica debe programarse a las 31 semanas de edad corregida; mientras que en los mayores de 27 SDG, debe hacerse 4 semanas posteriores al nacimiento. <sup>12</sup>

## **ESTADIFICACIÓN DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO**

La gravedad de la ROP se determina mediante estadios y zonas; se describen 5 estadios de enfermedad, y tres zonas de afectación. Las zonas se refieren a la parte de la retina afectada por la enfermedad ([Ver Imagen 1](#)):

*Zona I ó Polo posterior:* Centrado en la papila, es un círculo cuyo radio es el doble de la distancia papila - mácula.

*Zona II ó Retina periférica:* Centrado en la papila abarca una zona circular entre el círculo interior de la zona I y una circunferencia exterior hasta la ora serrata nasal.

*Zona III ó Extrema periferia:* Zona residual en forma de medialuna entre el círculo exterior de la zona II y ora serrata del lado temporal.

En cuanto los estadios se describen 5 estadios progresivos:

*Estadio 1:* Línea de demarcación de una zona avascular con bordes nítidos pero no sobreelevado.

*Estadio 2:* Línea de demarcación sobreelevada de la zona avascular o "cordón".

*Estadio 3:* Proliferación fibrovascular extrarretiniana con vasos terminales en "abanico", con "ovillos" vasculares y hemorragias sobre el "cordón".

*Estadio 4:* Desprendimiento traccional de retina periférico: (a) El desprendimiento no llega a la zona macular o fóvea. (b) El desprendimiento llega hasta la mácula o fóvea.

*Estadio 5:* Desprendimiento total de retina (fibroplasia retrolental).

### ***Enfermedad Plus***

Tortuosidad arterial y dilatación venosa en polo posterior que al menos abarque 2 meridianos de la fotografía estándar de zona I.

### ***Enfermedad Preumbral***

Tomando en cuenta la zona afectada, el estadio presente y los meridianos afectados se ha clasificado a la ROP en dos tipos, de alto riesgo (enfermedad preumbral tipo I) y de bajo riesgo (enfermedad preumbral tipo II) para presentar ceguera.

#### ***ROP Preumbral tipo I:***

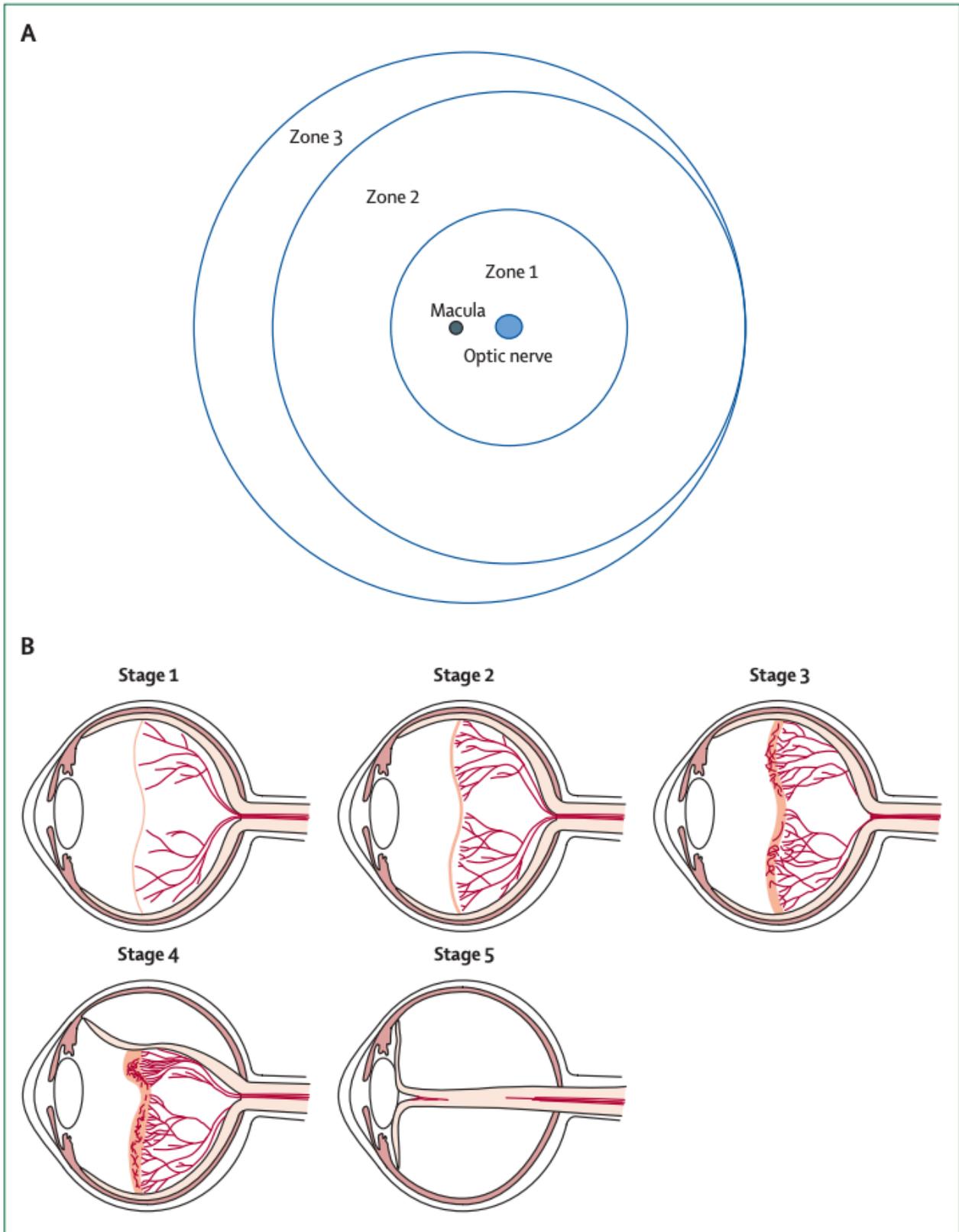
- Zona I, cualquier estadio de ROP con enfermedad plus
- Zona I, Estadio 3 ROP +/- plus
- Zona II, Estadio 2 o 3 con enfermedad plus

#### ***ROP Preumbral tipo II:***

- Zona I, Estadios 1 o 2 sin enfermedad plus
- Zona II, Estadio 3 sin enfermedad plus

La enfermedad preumbral Tipo I debe recibir tratamiento antes de 72 hrs. a partir del diagnóstico y la enfermedad preumbral Tipo II requiere vigilancia.

La implementación de estos criterios, ha dado como resultado, que bebés cada vez más pequeños sean incluidos en las revisiones y por lo tanto requieran tratamiento en edades tempranas cuando las complicaciones sistémicas como la apnea, bradicardia o reintubación son más comunes y por lo tanto las revisiones de seguimiento también serán necesarias para niños con ROP preumbral tipo II.<sup>9</sup>



**Imagen 1.** Estadificación ROP: zonas y estadios. Reproducida de Lancet 2013; 382: 1445–57

## **FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)**

VEGF es uno de los mediadores más potentes de la regulación vascular en la angiogénesis, además de mediar la permeabilidad vascular al agua y proteínas. Se cree que VEGF puede aumentar la permeabilidad vascular 50.000 veces más que la histamina. También se ha reportado que el VEGF induce la fenestración en células endoteliales tanto in vivo como in vitro. En los últimos años varios miembros de la familia de genes de VEGF han sido identificadas, incluyendo VEGF-A , VEGF-B , VEGF-C , VEGF-D , VEGF-E, y factor de crecimiento placentario ( PIGF ). La molécula más estudiado de la familia de VEGF es VEGF-A.

El gen VEGF humano se localiza en el cromosoma 6p21.3 y está organizado en ocho exones , separados por siete intrones. Existen distintas isoformas del VEGF humano incluyendo: 121 , 145 , 165 , 183 , 189 y 206 aminoácidos ( VEGF121 , VEGF145, VEGF165, VEGF183 , VEGF189 y VEGF206 respectivamente ), los cuales se forman de las modificaciones alternadas sobre los exones de un solo gen. Dado su actividad y potencia biológica, VEGF165 es la isoforma predominante del VEGF. El VEGF nativo está unido a la heparina , y es una glicoproteína básica, homodimérica de **45 kDa**.

La actividad biológica del VEGF es dependiente de su unión con receptores específicos. Tres receptores diferentes pertenecientes a la familia de receptores de tirosina-quinasa se han identificado: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 (KDR), y VEGFR-3 (Flt-4). Tanto VEGFR-1 y VEGFR-2 tienen dominios de tipo inmunoglobulina extracelulares, así como un único dominio transmembrana tirosina quinasa y se expresan en distintas células. Neurofilina-1, es un receptor para semaforinas en el sistema nervioso, es también un receptor para las isoformas de VEGF y PIGF que se unen a la heparina. Sin embargo, no hay evidencia de la señalización por neurofilinas después de su unión a VEGF. <sup>13</sup>

El VEGF es indispensable para el desarrollo de órganos vitales como pulmones, riñones y cerebro; de igual manera tiene un papel protagónico en la maduración retiniana. Múltiples estudios han comprobado que el aumento intraocular de VEGF favorece la respuesta vasoproliferativa en ROP. El VEGF es una proteína que juega un papel fundamental tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis a nivel sistémico; se produce primordialmente en el endotelio vascular, aunque ya se ha documentado su expresión en otros tejidos. <sup>14</sup>

### ***Donde podemos medir VEGF?***

El VEGF se ha medido en varios tipos de fluidos y células. Los fluidos más comúnmente utilizadas para mediciones son la sangre (suero o plasma), el lavado broncoalveolar (BAL), esputo, las células epiteliales bronquiales, células alveolares tipo II, macrófagos alveolares,

neutrófilos, células endoteliales de los capilares de los alvéolos, y de células musculares lisas vasculares.

Es importante señalar que los niveles de VEGF en suero son mas altos en comparación con los medidos en el plasma. La razón de esta diferencia, es que el VEGF en suero refleja la liberación de VEGF a partir de plaquetas y leucocitos durante la coagulación de la sangre, lo que resulta en un aumento de las concentraciones de VEGF 2 a 7 veces más en suero. En personas sanas, los niveles de VEGF en fluido epitelial son 500 veces más altos que los niveles plasmáticos, sugiriendo que el epitelio sirve como reservorio y como barrera para el VEGF, sin embargo en caso de alteraciones estructurales causadas por alguna enfermedad esta barrera puede verse dañada; y es por eso que en algunas enfermedades pulmonares los niveles séricos de VEGF suelen ser más altos que en los controles sanos.<sup>17</sup>

### ***VEGF en distintos órganos***

#### *Pulmón*

Evidencia reciente sugiere que la vascularización en los pulmones promueve activamente el desarrollo alveolar normal. La inactivación de VEGF en los primeros días de vida resulta en un incremento de la mortalidad, atrofia corporal generalizada, y retraso del desarrollo de órganos. La dependencia de VEGF termina, aproximadamente, 4 semanas posteriores al nacimiento, periodo que coincide con el final de la alveolización y la maduración vascular en el pulmón.<sup>15</sup>

Algunas isoformas de VEGF (120,164 y 168) están presentes en células alveolares tipo II en modelos animales, su pico de expresión se da durante el mayor desarrollo de vasos en el pulmón, disminuye al día 10 de vida, para incrementarse nuevamente a niveles que se mantienen el resto de la vida.<sup>15</sup>

El bloqueo del VEGF tanto farmacológico como genético durante el desarrollo pulmonar provocan pérdida de alveolización y disminución de la densidad arterial, características presentes en la bronco-displasia pulmonar (BDP). Experimentos en ratas demuestran que el VEGF no solo se requiere durante el desarrollo pulmonar, sino también a lo largo de la vida, ya que al bloquearlo, los animales muestran cambios estructurales compatibles con enfisema.<sup>15</sup>

Los niños con BDP presentan niveles menores de RNAm de VEGF que los niños que no presentaron la enfermedad. Se han reportado niveles de VEGF más bajos, en los aspirados traqueales de los recién nacidos prematuros que mueren por síndrome de dificultad respiratoria grave, que en los sobrevivientes; y en recién nacidos que desarrollaron BPD comparados con los bebés prematuros que sobrevivieron y no presentaron complicaciones pulmonares.<sup>15</sup>

La hipoxia es el principal estimulador de la expresión de VEGF. La exposición prematura del pulmón en desarrollo a un ambiente de hiperoxia puede disminuir la expresión de VEGF. Aun en ambientes con concentraciones de oxígeno al 21%, el nacimiento prematuro por sí solo puede interferir con el desarrollo pulmonar normal. Los capilares inmaduros generados por VEGF producen fuga y como consecuencia edema pulmonar.

#### *Riñón*

El VEGF se expresa en las células glomerulares tanto en el riñón adulto como en el fetal. Por medio de inmunohistoquímica se ha podido demostrar su presencia tanto en la matriz extracelular como en las células glomerulares. En algunos trabajos se ha podido comprobar la presencia de VEGF en los túbulos renales también, sin embargo su expresión es mucho menor que en los glomérulos.<sup>16</sup> Aparentemente la membrana basal de los glomérulos sirve como reservorio de VEGF, de aquí es liberada a las células endoteliales de los capilares renales; y de esta forma se completa el ciclo paracrino de la proteína en el riñón. Se cree que el VEGF es necesario para la fenestración de las células epiteliales glomerulares, característica esencial para la ultrafiltración renal. En el riñón, los gatillos de expresión de VEGF son la hipoxia y la hiperglicemia. Al igual que en el pulmón, el VEGF en el riñón está elevado o bajo en distintas patologías, por ejemplo, se ha visto como el VEGF se puede detectar en orina de pacientes sanos; pero al comparar con la excreción en pacientes con glomerulonefritis necrotizante, en esta última se encontraba mucho más elevado.<sup>16</sup>

#### *Cerebro*

Se ha demostrado como el VEGF y su receptor VEGFR-2 son expresados en el cerebro y cerebelo tanto en formación como posterior al nacimiento.<sup>17</sup> Además se ha documentado como un factor pronóstico importante para la dilatación intraventricular posterior a hemorragia en prematuros, teniendo una sensibilidad de 96% y una especificidad del 100% con un valor de corte, medido en suero de 135 pg/ml.<sup>18</sup>

#### ***VEGF en Retinopatía Inducida por Oxígeno***

Existen una gran variedad de modelos experimentales que han podido documentar el aumento de VEGF intraocular en respuesta a la hipoxia. Sin embargo no todos coinciden en sus conclusiones, por ejemplo, Budd y colaboradores documentaron el aumento de VEGF en retinas de un modelo animal de retinopatía inducida por oxígeno (fluctuaciones 50-10% por 14 días) comparados con animales en oxígeno ambiental; los autores aseguran que no pudieron sustentar la teoría bifásica de ROP, debido a que los niveles de VEGF ocular se vieron incrementados aún en condiciones de hiperoxia; sugiriendo que el estímulo para el aumento de esta proteína en el ojo es la superficie de retina avascular y no las fluctuaciones en los niveles de oxígeno.<sup>19</sup> A este respecto Saito y colaboradores postularon que el VEGF se incrementa

intraocularmente en respuesta a la isquemia tisular aun en presencia de oxígeno suplementario debido a la inmadurez tanto de la coroides como de la vasculatura retiniana. Ellos sugieren que las células de la retina interna (células de Müller y células ganglionares) detectan la hipoxia y son las principales productoras de VEGF. El aumento en las concentraciones de oxígeno en la retina reduciría en teoría el estímulo para la expresión de VEGF, sin embargo, como se produce el desarrollo de los fotorreceptores la demanda metabólica de la retina externa aumenta. La evidencia implica a los fotorreceptores en la creación de la demanda de oxígeno que resulta en las características clínicas observadas en modelos de ROP.<sup>10</sup>

En animales adultos, la coroides es la principal fuente de oxígeno en zonas de retina avascular, sin embargo en los modelos animales de ratas prematuras la coroides en el día 15 de vida no es capaz de transmitir el oxígeno suplementario, al igual que la vasculatura retiniana inmadura, por lo tanto la hipoxia tisular aumenta aún con mayores concentraciones de oxígeno. Por lo tanto el oxígeno suplementario como las fluctuaciones en el mismo pueden causar que empeore la ROP. <sup>10</sup>

### ***VEGF sérico en prematuros con ROP***

El estudio de Du y colaboradores en China, realizó una comparación entre los niveles VEGF sérico de 184 recién nacidos. Realizaron sus comparaciones entre 3 grupos divididos por edad gestacional ( < 32 SDG, 32-36 SDG y RN término) y 2 divididos por el uso o no de oxígeno suplementario. Además se estudio un grupo de ROP en el que todos los participantes pesaron menos de 2000 grs. al nacimiento. Midieron VEGF por ELISA cada 2 semanas hasta que se dio de alta a los niños. Encontraron que el VEGF disminuyó en los niños prematuros y permaneció estable en los de término, en los tres grupos SIN uso de oxígeno. El VEGF en niños de 32-36 semanas era significativamente mayor que los de los bebés de término en la semana 1 y 3 ( $522 \pm 224$  vs.  $247 \pm 123$ ,  $P = 0.000$ ;  $393 \pm 220$  vs.  $247 \pm 177$ ,  $P = 0.022$ ). Pero al comparar los bebés menores de 32 semanas con los de término no se encontraron diferencias importantes. En el grupo de 32 a 36 SDG hubo diferencias significativas en los niveles séricos de VEGF, entre los grupos con y sin oxígeno durante la semana 1 y 3 ( $324 \pm 148$  vs  $522 \pm 224$ ,  $P < 0.0001$ ;  $264 \pm 106$  vs.  $393 \pm 220$ ,  $P = 0.005$ ). Además encontraron que los niveles de VEGF dentro del grupo de niños prematuros eran mayores en aquellos que desarrollaron retinopatía comparado con los que no la desarrollaron a la semana 31 de edad corregida ( $515 \pm 154$  vs.  $347 \pm 161$ ,  $P = 0.047$ ).<sup>20</sup>

Villegas y colaboradores publicaron su investigación en 2006, realizaron una determinación sérica de 3 diferentes moléculas en neonatos prematuros: VEGF, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Incluyeron 74 prematuros menores de 32SDG, con menos de 1500 gramos de peso al nacimiento y los dividieron en dos grupos para su estudio, los que presentaron ROP (n=37) y

los que no la desarrollaron (n= 37). Los sujetos fueron evaluados oftalmológicamente y en ese momento se tomó la muestra de sangre periférica (1ml) para la determinación de citocinas. Analizaron su papel como factores pronósticos para retinopatía del prematuro, realizando comparaciones con t de Student y análisis multivariado . Encontraron una media de VEGF, de 510.81 pg/ml en el grupo de prematuros sin ROP y 708.30 pg/ml en el grupo con ROP, con una desviación estándar de 150.03 y 287.87 respectivamente; concluyendo que el VEGF es un factor riesgo y el IGF-1 es un factor protector para la enfermedad. Además desarrollaron una fórmula a través de la cual puedes estimar la probabilidad de desarrollar ROP a partir de las mediciones en suero de VEGF y de IGF-1.<sup>21</sup>

Un estudio realizado en Irán en 2013 reportó no encontrar diferencias en las mediciones de VEGF en suero de prematuros que desarrollaron ROP comparadas con los que no la presentaron, encontrando niveles de  $267.35 \pm 103.43$  pg / ml en el grupo con ROP y  $237.52 \pm 130.92$  pg / ml en el grupo control.<sup>22</sup>

Sato y colaboradores en 2012 <sup>23</sup> encontraron bevacizumab en circulación sistémica posterior a su aplicación intraocular en prematuros, incluso 2 semanas después del tratamiento, detectando cifras entre 844 y 1542 ng/dl; su estudio fue una serie de 11 casos con mediciones incompletas por falta de volumen en muestras obtenidas; todos sus sujetos recibieron previo a el antiangiogénico, láser diodo. Las concentraciones séricas de VEGF, en 3 casos con mediciones completas, hubo una disminución progresiva de distinta magnitud; en uno de ellos, el comportamiento fue distinto, con cifras de 2110, 433, 331 y 439 pg/ml, previo a la aplicación del medicamento, un día, una semana y dos semanas posteriores a la aplicación respectivamente. Este estudio despertó muchas interrogantes con respecto a la seguridad del uso de éstos medicamentos ya que sus resultados sugirieron que el bevacizumab al alcanzar la circulación sistémica y disminuir los niveles séricos de VEGF podía generar efectos adversos graves en prematuros.

En 2014 la revista de la Academia Americana de Oftalmología publica un estudio que mostró disminución progresiva de los niveles plasmáticos de VEGF-A, sVEGFR-2 y sTie2, en 30 infantes con ROP tratados con fotocoagulación láser, se realizaron mediciones el primer día y una semana después del tratamiento, los valores iniciales no mostraron diferencias independientemente de la presentación unilateral o bilateral de la enfermedad, así como la zona afectada.<sup>24</sup>

Cinco años más tarde en 2019 Fetal and Pediatric Pathology Journal publica otra serie corta de casos (n=11) donde los autores encontraron una disminución significativa ( $p = 0.045$ ) en los niveles séricos de VEGF siete días posteriores a la aplicación de láser, comparado con las concentraciones registradas un día previo al tratamiento.<sup>25</sup>

## **FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PLGF)**

Esta proteína pro-angiogénica fue aislada por primera vez de placenta humana de un embarazo a término en 1991. Su segunda isoforma PIGF-2, fue aislada de un coriocarcinoma humano 2 años más tarde. El PIGF comparte el 53% de su estructura con el VEGF, específicamente con la porción denominada "PDGF-like", la cual es una fracción de la proteína similar a el factor de crecimiento derivado de plaquetas. En animales el PIGF estimula el crecimiento de células endoteliales de pulmón y células endoteliales de capilares en la corteza suprarrenal.<sup>26</sup>

Es una glicoproteína dimérica de **46 kDa**, actualmente se conocen 4 isoformas: 131(PIGF-1), 152(PIGF-2), 203 (PIGF-3) y 224 (PIGF-4).<sup>27</sup> Numerosos tipos celulares son capaces de producirla en respuesta al estrés, la hipoxia, la inflamación y el trauma.<sup>28</sup>

A diferencia del VEGF-A que es capaz de unirse tanto a VEGFR-1 como a VEGFR-2, el PIGF sólo se une a VEGFR-1, protegiendo a los vasos de la obliteración causada por la hiperoxia y evitando la neovascularización y el edema. La cantidad de VEGF y PIGF determina la unión a su receptor, mientras que la expresión de VEGFR-1 y 2 determina la naturaleza de las señales transmitidas. De esta manera al existir gran cantidad de PIGF, éste es capaz de unirse a VEGFR-1 y desplazar al VEGF a su receptor VEGFR-2 modificando el efecto final de estas proteínas proangiogénicas. Además el VEGF y PIGF son capaces de formar heterodímeros los cuales inactivan a ambas moléculas, y de igual manera VEGFR-1 y 2 son capaces de formar heterodímeros entre ellos y de esta manera alterar las señales desencadenadas por su activación.<sup>29</sup>

### ***PIGF en distintos órganos***

#### *Cerebro*

Recientemente el PIGF ha sido reconocido como un factor tanto neurotrófico como neuroprotector en lesiones isquémicas cerebrales. Beck y col. demostraron como el PIGF y su RNAm se expresan en neuronas del cerebro en condiciones normales, más no en astrocitos y vasos sanguíneos; sin embargo 3 días posteriores a una lesión isquémica la expresión de PIGF aumenta en la zona alrededor del infarto, así como en las neuronas y astrocitos en el borde de la zona isquémica. El efecto neuroprotector del PIGF ha sido comprobado en un estudio in vitro, el cual mostró que éste promueve la supervivencia de cultivos celulares de neuronas corticales bajo condiciones de privación de glucosa y oxígeno.<sup>24</sup>

#### *Pulmón*

En 2008 Janér y col. demostraron que el PIGF se expresa de manera consistente en el epitelio de las vías aéreas durante el desarrollo pulmonar, y fue encontrado tan tempranamente como a la semana 14 de edad gestacional. Ellos encontraron una correlación positiva entre PIGF expresado en los alvéolos y las células cuboideas del epitelio pulmonar, con un peso bajo al nacimiento y una menor edad gestacional. Sin embargo no pudieron demostrar correlación de éstas dos últimas variables con los niveles de PIGF medidos en fluido traqueo-alveolar (FTA). La media de PIGF medido en FTA fue de  $0.64 \pm 0.42$  pg/ml. Con los resultados de éste y otros estudios previos de estos autores concluyen que la inflamación pulmonar en el periodo perinatal obstaculiza la alveolización disminuyendo la angiogénesis, esto se ve reflejado con la disminución de las concentraciones de PIGF en FTA, y la inflamación puede ser un factor importante para el desarrollo de displasia bronco-pulmonar (BDP), de ésta manera se explica la contribución del PIGF en la aparición de BDP.<sup>30</sup>

## **LA RETINA COMO BARRERA**

La difusión de moléculas a través de la retina neurosensorial puede repercutir en la apariencia clínica y el curso de varias enfermedades. La retención de proteínas de alto peso molecular, ya sea de los capilares de la retina con fugas o de la barrera hemato-retiniana externa, dañada, puede ejercer una fuerza osmótica que podrían causar o agravar el edema retiniano. Las barreras a la difusión intrarretinianas también pueden influir en el éxito de la administración de fármacos intravítreos y su transporte a las capas externas de la retina y el espacio subretiniano.

El estudio de Jackson y colaboradores encontró que partículas mayores de 77 kDa no se difunden de manera libre a través de la retina humana, sin embargo ellos reconocen que este es un umbral relativo, ya que los estudios se realizaron en retinas fijadas. Concluyen que tanto la capa plexiforme interna como externa sirven como barreras principales a la difusión libre de sustancias a través de la retina.<sup>31</sup>

En condiciones de normalidad el ojo es un órgano relativamente aislado de la influencia de sustancias en la circulación sistémica y de igual manera su contribución a la modificación de proteínas circulantes debe ser mínimo o nulo. Sin embargo en presencia de enfermedad éstas aseveraciones pueden no ser correctas, ya que probablemente el flujo hacia el interior o el exterior del ojo puede modificarse, permitiendo el paso libre de sustancias con peso molecular mayor al umbral anteriormente mencionado.

La longitud axial esperada de un recién nacido de término es aproximadamente de 16 mm,<sup>32</sup> lo cual nos daría un volumen intraocular aproximado de  $2.5 \text{ cm}^3$ ; mientras que en el recién nacido pretérmino se han documentado longitudes axiales entre 12 y 13 mm correspondientes a un volumen intraocular de aproximadamente  $1.1 \text{ cm}^3$ . El área de superficie

retiniana en neonatos pretérmino de 30 SDG es aproximadamente de 350 mm<sup>2</sup>, el cual se incrementa prácticamente al doble para las 50 semanas de edad postmenstrual (650 mm<sup>2</sup>).<sup>33</sup> El volumen sanguíneo de un neonato prematuro es de 90 a 100 ml/kg de peso,<sup>34</sup> si suponemos un peso promedio de 1500 gramos, el volumen sanguíneo total de un neonato con este peso sería de 150 ml o 150 cm<sup>3</sup>; por lo cual resulta lógico deducir que el aporte ocular de proteínas (VEGF o PIGF) a la circulación sistémica y por lo tanto al suero, es mínima.

Moléculas como VEGF y PIGF están presentes de forma intraocular en ROP; aún asumiendo un paso libre de éstas entre el ambiente intraocular y la circulación sistémica, si tomamos en cuenta el volumen ocular en prematuros y lo comparamos con el volumen sanguíneo circulante esperado, modificaciones importantes en suero de éstas moléculas, únicamente por la presencia de una patología ocular es poco probable.

## **TRATAMIENTO EN ROP**

Hasta el momento 2 modalidades de tratamiento han mostrado efectividad en el tratamiento de la ROP. La primera documentada en el ensayo clínico CRYO-ROP (n=291) en 1988, en el cual se demostró que la crioterapia aplicada a la retina avascular periférica redujo a la mitad los resultados visuales y estructurales desfavorables en ROP.<sup>35</sup> Posteriormente el ensayo clínico ET-ROP (n=401) encontró que la aplicación de fotocoagulación con láser diodo en enfermedad preumbral tipo I mejoraba los resultados visuales y estructurales comparado con un manejo convencional, es decir tratar en un momento más avanzado de la enfermedad (enfermedad umbral).<sup>14</sup>

Estudios de seguimiento a 10 y 15 años de los pacientes tratados con crioterapia han demostrado que aunque los resultados visuales son estables, difieren entre láser y crioterapia; los pacientes tratados con ésta última tienden a desarrollar defectos refractivos de mayor magnitud, comprometiendo el resultado visual final, además de conferir un riesgo aumentado de complicaciones a largo plazo como desprendimiento de retina por los cambios anatómicos propios de la aplicación del tratamiento en la retina avascular.<sup>36</sup>

La infraestructura, recursos humanos y materiales necesarios para aplicar láser diodo a un prematuro son numerosos, teniendo como requerimientos mínimos un neonatólogo, un anestesiólogo pediatra, un oftalmólogo pediatra con entrenamiento específico en ROP, personal de enfermería, un quirófano equipado para garantizar el bienestar del niño durante el procedimiento (medicamentos, carro de anestesia, colchón térmico, instrumental oftalmológico, etc.) y láser diodo indirecto. Por lo tanto son pocos los centros aptos para aplicar este tratamiento.

Ante la necesidad de no permanecer como simples observadores de la enfermedad, se han utilizado recientemente antiangiogénicos intravítreos para el tratamiento de ROP, esta

medida terapéutica carece de autorización oficial para su uso en prematuros y la evidencia que apoye su utilización es escasa.

El ensayo clínico BEAT-ROP (n=150) demostró la efectividad de bevacizumab (anticuerpo monoclonal de unión a VEGF) para el tratamiento de ROP en estadio 3 con enfermedad plus, comparado con el tratamiento convencional con láser diodo, su principal medida de desenlace fue la reactivación de la ROP a las 54 semanas de edad postmenstrual. Las conclusiones indican que bevacizumab es tan bueno como el láser en ROP estadio 3 y enfermedad plus, si se encuentra en zona I únicamente, pero este ensayo clínico no fue diseñado para evaluar la seguridad del medicamento por lo cual ha sido blanco de múltiples críticas.<sup>9</sup>

## **PUNTAJE SNAP-PE II**

Para poder valorar con una estrategia lo más objetiva posible la gravedad de un recién nacido prematuro, se han diseñado distintas escalas, entre las más utilizadas se encuentra el puntaje para fisiología neonatal en agudo, por sus siglas en inglés: SNAP (Score for Neonatal Acute Physiology) y su extensión perinatal (SNAP-PE II), la cuál ha mostrado ser de gran utilidad para predecir mortalidad en neonatos prematuros, usando parámetros clínicos y paraclínicos medidos durante las primeras 12 horas de hospitalización en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN). Richardson y colaboradores realizaron su primera publicación en 1992, aunque la escala completa no fue dada a conocer con detalle hasta 1996, sin embargo ésta constaba de 26 aspectos a evaluar, por lo que era complicado realizarla completa. Fue hasta el año 2001 en que se publicó la versión simplificada y con extensión perinatal, ésta fue probada en 14000 recién nacidos siendo un excelente predictor de mortalidad.<sup>37</sup>

En adelante ha sido probada como predictor para distintas patologías del recién nacido de bajo peso o prematuro, como la broncodisplasia pulmonar, problemas neurológicos y Retinopatía del Prematuro (ROP). Fortes y colaboradores intentaron validar la escala SNAP-PE II como predictor de ROP en 2007 en 304 infantes, aunque los valores en la escala eran francamente mayores al ingreso a UCIN en los niños que desarrollaron ROP, al realizar el ajuste con regresión logística se encontró que este puntaje en realidad no era útil para predecir ROP. En su discusión ellos comentan un punto clave para estos hallazgos y es que la condición de salud de los infantes puede modificarse de manera impredecible, es decir un niño que ingreso muy grave; y por lo tanto obtuvo un puntaje alto, puede evolucionar satisfactoriamente y no desarrollar ROP en el momento del tamizaje; mientras que un niño que se encontraba estable a su ingreso (puntaje bajo de SNAP-PE II) puede tener tórpida evolución clínica en las siguientes semanas, y desarrollar ROP.<sup>38</sup>

Aunque este puntaje no fue diseñado para ser medido de forma acumulada y repetida, ya ha sido utilizado en estas condiciones por otros autores encontrándola de utilidad para predecir eventos neurológicos a largo plazo, solo realizando algunos ajustes en caso de no tener todas las mediciones necesarias o convirtiendo algunas variables para simplificar su registro.<sup>39</sup>

## **JUSTIFICACIÓN**

La retinopatía del prematuro (ROP) se ha colocado como causa líder de discapacidad visual y ceguera en países en vías de desarrollo. La ROP es una enfermedad multifactorial compleja de progresión rápida que requiere tratamiento dentro de las 72 horas posteriores a su diagnóstico para evitar ceguera irreversible.

Asumir que los cambios observados en VEGF y PIGF séricos, son consecuencia de una maniobra intraocular (administración de medicamento intravítreo) podría significar un error en ausencia de evidencia que demuestre los cambios de éstas proteínas en un grupo sin tratamiento. Diseñar un ensayo clínico con dichas características sería éticamente imposible. Tomando en cuenta que son múltiples los órganos y sistemas que producen éstas proteínas y de igual forma sufren transformaciones debido a ellas; sería de utilidad conocer sus fluctuaciones en prematuros sin tratamiento oftalmológico específico para ROP, y de esta forma establecer un posible patrón de comportamiento, en ausencia de intervenciones a nivel ocular que podrían modificarlas.

La contribución al conocimiento del comportamiento de VEGF y PIGF en suero de prematuros, ayudará a aportar evidencia que pueda ser utilizada en futuras investigaciones para sustentar la seguridad de medicamentos (anti-angiogénicos intravítreos), económicos y con requerimientos logísticos más sencillos, para una patología potencialmente discapacitante como la ROP; que permitan ofrecer tratamiento oportuno a todos los niños en riesgo de ceguera.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La ROP es la causa no. 1 de ceguera en población pediátrica. Las condiciones de salud general, de la gran mayoría de los prematuros en riesgo de desarrollar ROP, son delicadas; el origen de la gravedad de éstos pacientes suele ser de muy distinta índole, pudiendo cursar con complicaciones neurológicas como hemorragias intraventriculares, cardiopatías congénitas, neumopatías, sepsis, complicaciones gastrointestinales, etc. La mayoría de los estudios publicados postulan éstas y otras patologías como factores de riesgo para desarrollar retinopatía, con grados variables de contribución. Los dos factores de riesgo consistentes en la mayoría de los estudios son el peso al nacimiento y la edad gestacional, los cuales suelen tener una correlación negativa con la retinopatía. SNAP-PE II es una escala validada para medir la gravedad y probabilidad de muerte en prematuros; algunos estudios sugieren su medición seriada puede ser una herramienta mayor utilidad predictiva.

Los avances en conocimiento y tecnología han permitido que un número mayor de niños prematuros sobrevivan y requieran tanto revisión de fondo de ojo para detección de la enfermedad, como tratamiento; incrementando de manera drástica los recursos humanos y

materiales necesarios para tener un programa de ROP exitoso, con el menor número de niños con discapacidad visual. La imperante necesidad de tratamiento inmediato y la creciente cantidad de casos que lo requieren, ha obligado a los especialistas en el área, a probar tratamientos más económicos, menos invasivos y con requerimientos logísticos más simples. Una de estas opciones han sido los llamados anti-angiogénicos, medicamentos que inhiben moléculas como el VEGF y el PIGF, que han sido probados con éxito en diversas patologías vasculares oftalmológicas en adultos. A pesar de los excelentes resultados tanto anatómicos como visuales en adultos, las dosis adecuadas en población pediátrica y la seguridad de su uso en niños prematuros continúan siendo una interrogante que requiere respuestas urgentes. Estudios clínicos aleatorizados han demostrado resultados equivalentes con el uso de anti-angiogénicos versus láser diodo en enfermedad en zona I estadio 3 (Preumbral tipo I)<sup>9</sup>; sin embargo en series de casos se ha cuestionado la seguridad de este procedimiento, demostrando la presencia de medicamento en torrente circulatorio hasta 2 semanas posteriores a la aplicación intraocular de dosis menores a las descritas para adultos <sup>23</sup>. Se ha argumentado que las disminuciones prolongadas de VEGF en sangre de prematuros pueden causar alteraciones en órganos afectados con patologías graves propias de éste grupo.<sup>40</sup>

Las concentraciones de VEGF y PIGF, al igual que la condición de salud general del sujeto, no son un valor estático y probablemente representan la combinación de distintas patologías en prematuros. Es probable que las modificaciones en estas proteínas sean un reflejo indirecto del estado de gravedad del prematuro; y secundario a éste estado de gravedad presenten un mayor riesgo de desarrollar retinopatía. Existen pocos estudios con mediciones seriadas de VEGF en prematuros que los relacionen con la gravedad sistémica del paciente (SNAP-PE II) y el riesgo de desarrollar ROP; de igual forma existe escasa evidencia del comportamiento del PIGF sérico en prematuros.

Conocer el comportamiento sérico habitual, de proteínas como VEGF y PIGF en prematuros que desarrollen o no retinopatía y la relación que guardan con el estado de salud general de los sujetos, nos permitirá contribuir con información relevante que posteriormente ayude a evaluar la respuesta a diversos tratamientos para ROP.

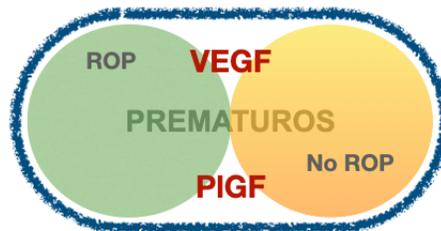
## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el comportamiento de los niveles séricos de VEGF y PIGF en prematuros con y sin retinopatía, durante el primer mes de vida?

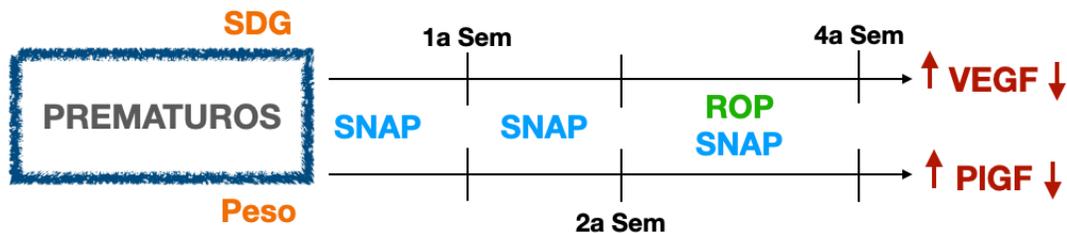
¿El estado de gravedad de los pacientes influirá sobre las modificaciones de éstas proteínas?

## OBJETIVOS GENERALES

1. Comparar los niveles séricos de VEGF y PIGF en neonatos prematuros con y sin retinopatía durante el primer mes de vida.



2. Determinar la influencia de la gravedad sistémica medida por SNAP-PE II sobre los cambios en las concentraciones de VEGF y PIGF en prematuros.



## Objetivos Específicos

Comparar los niveles séricos de VEGF y PIGF en neonatos prematuros con y sin retinopatía, a la semana de vida, 2 semanas y en el momento del tamiz oftalmológico.

## HIPÓTESIS

1. Los niveles séricos VEGF\* y PLGF en neonatos prematuros sin retinopatía serán más bajos que en neonatos prematuros con retinopatía, y tenderán a disminuir en ambos grupos durante el primer mes de vida. (\*De acuerdo a la referencia 25, la diferencia de medias esperada es de 200 pg/ml)
2. A mayor puntuación en la escala SNAP-PE II, mayor concentración sérica de VEGF y PIGF, independientemente de la presencia o no de retinopatía.

## METODOLOGÍA

**Lugar donde se desarrollará el estudio:** Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga

**Recursos materiales:** El Hospital Infantil de México a través del concurso para obtener recursos federales para investigación en salud aportó: oftalmoscopio indirecto, blefarostatos, lupas de 28 dioptrías, tubos recolectores, micropipetas, kits de ELISA y material de laboratorio necesario para la implementación de la investigación. De igual forma el sustentante de la presente tesis contó con beca CONACYT durante la duración de la carga académica de la maestría.

**Diseño del estudio:** analítico, observacional, prospectivo y longitudinal

**Población de estudio:** Neonatos nacidos en el Hospital General de México, con factores de riesgo para desarrollo de retinopatía del prematuro.

### **Criterios de inclusión**

- Todos los neonatos menores de 34 SDG, nacidos en el Hospital General de México.
- Neonatos menores de 1750 gramos de peso al nacimiento, nacidos en el Hospital General de México.
- Autorización de ambos o uno de los padres para toma de muestras sanguíneas con propósitos de investigación.

### **Criterios de exclusión**

- Malformaciones congénitas oculares que impidan la revisión del fondo de ojo.

## **Criterios de eliminación**

- Contraindicación absoluta para toma de muestras o revisión oftalmológica bajo midriasis farmacológica. *Contraindicación absoluta*: trombocitopenia severa [conteo plaquetario  $<50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ ]<sup>41</sup> ó inestabilidad hemodinámica [paciente en estado de choque o recibiendo maniobras de reanimación, bradicardia o taquicardia severa con la colocación de blefarostato o indentación escleral, bradipnea con manipulación ocular necesaria], persistente por mas de 2 semanas posteriores al momento ideal del tamiz oftalmológico, que impida la realización oportuna del mismo.
- Falta de cumplimiento con la toma de muestras o el seguimiento para fundoscopia.
- Mala calidad en el procesamiento de las muestras de suero.

## **Variables a Estudiar ([Ver Anexo II](#))**

### ***Variables Dependientes***

1. Niveles séricos de VEGF y PIGF: medida en pg/ml mediante ELISA. Cuantitativa continua.

### ***Variables Independientes***

1. Retinopatía del prematuro: presencia o ausencia de alteraciones retinianas compatibles con retinopatía secundaria a prematuridad. Cualitativa dicotómica.
2. Estado de gravedad del neonato: medido mediante la escala SNAP-PE II.

## **Variables Descriptivas**

1. Edad gestacional: semanas cumplidas de gestación al momento del nacimiento. Cuantitativa discreta.
2. Peso al nacimiento: en gramos. Cuantitativa continua.
3. Oxígeno Terapia: administración de oxígeno con fines terapéuticos. Cualitativa dicotómica.
4. Duración de la Oxígeno Terapia: unidad de tiempo durante la cual se aplicó oxígeno con fines terapéuticos. Se medirá en días. Cuantitativa discreta.

## **Mediciones**

- Revisión de fondo de ojo:
  - Menores de 27 SDG: a la semana 31 de edad corregida .
  - Mayores de 27 SDG: a las 4 semanas de edad cronológica.
- Se tomaron 3 muestras sanguíneas de 1 ml : semana 1, 2 y 4 de vida, ésta última coincidiendo con el momento del tamiz oftalmológico.

## Cálculo de Tamaño de Muestra

Basados en lo publicado por Villegas y col. <sup>21</sup>, se calculó un tamaño de muestra con el paquete estadístico STATA16 utilizando fórmula para diferencia de medias en las concentraciones de VEGF (pg/ml), con un alpha de 0.05 y un poder del 80%, a una cola; obteniendo un total de **36** sujetos, 18 por grupo.

```
Estimated sample sizes for a two-sample means test
Satterthwaite's t test assuming unequal variances
Ho: m2 = m1 versus Ha: m2 < m1

Study parameters:

      alpha =    0.0500
      power =    0.8000
      delta = -197.4900
        m1 =   708.3000
        m2 =   510.8100
       sd1 =   287.8700
       sd2 =   150.0300

Estimated sample sizes:

           N =         36
      N per group =       18
```

## PROCEDIMIENTO

### ***Estrategias para el reclutamiento de pacientes***

El investigador principal (Dra. Zaira del Carmen Bernal Díaz) fue el responsable directo de la inclusión de pacientes en el presente protocolo de investigación. Acudió diariamente al servicio de Ginecología y Obstetricia, específicamente a el área de Toco-Cirugía para realizar un censo de los nuevos nacimientos cuyos productos hubieran sido obtenidos vivos y cuenten con menos de 34 semanas de gestación ó presentaran peso al nacimiento menor o igual a 1750 gramos.

Una vez realizado el censo se procedió a contactar a los padres del menor para invitarlos a participar en el protocolo. Se les explicó en qué consistía el protocolo de investigación y se les hizo entrega del consentimiento informado ([Ver Anexo III](#)). Si los padres autorizaban la participación del menor en la investigación se procedió a realizar la primera toma de muestra sanguínea (semana 1 de vida), éstas fueron transportadas y preservadas según lo establecido en el apartado de bioseguridad. Se realizó la primera evaluación de la escala de SNAP-PE II y se registraron el puntaje obtenido junto con los demás datos personales y demográficos incluidos en la Hoja de Recolección ([Ver Anexo IV](#)).

Una semana posterior a esta fecha se contactó vía telefónica ó personal dentro del hospital a los padres o tutores legales del menor para verificar su situación actual (vivo/muerto/hospitalizado/en casa). Si el menor continuaba hospitalizado en el Hospital General de México en la semana 2 de vida, la toma de la segunda muestra sanguínea y el registro de los datos correspondientes de la escala SNAP-PE II se llevaron a cabo en dicha institución. En el caso de paciente que hubiera sido dados de alta, eran citados en el área de Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital General de México. Ya en ésta área el investigador principal recibió a los sujetos, realizó una breve entrevista para valorar nuevamente el puntaje de la escala SNAP-PE II y los llevó personalmente al área designada para toma de muestras donde un médico pediatra en entrenamiento de sub-especialidad de Neonatología auxilió con las tomas de sangre correspondientes.

Tres días previos a la fecha adecuada para el tamiz oftalmológico, dependiendo de la edad gestacional, se contactó nuevamente a los padres o tutores legales del menor, se verificó situación actual (vivo/muerto/hospitalizado/en casa) y se programó la revisión oftalmológica necesaria para el diagnóstico de ROP y la toma de la tercera y última muestra sanguínea (semana 4 de vida). Una vez más ambos procedimientos fueron realizados bajo los lineamientos establecidos por la institución en donde se encontraba el menor.

### ***Revisión de Fondo de Ojo para detección de ROP***

El tamiz oftalmológico para ROP contempla realizar una revisión de fondo de ojo bajo midriasis farmacológica con indentación escleral de los 360° de la superficie de retina periférica mediante oftalmoscopia indirecta. La midriasis se logró colocando una gota en cada ojo de tropicamida con fenilefrina (TP ofteno) en un máximo de dos ocasiones al menos 30 minutos previos a la revisión de fondo de ojo. Previo a la revisión oftalmológica se utilizó tetracaína como anestésico tópico en ambos ojos, la fundoscopia se realizó con lupa de 28 dioptrías. En todos los casos se contó con la presencia de un médico pediatra durante la oftalmoscopia quien monitorizó al paciente y decidió medidas de soporte adicionales de ser necesarias.

Además se evaluó el segmento anterior, en busca de neovascularización en iris (rubeosis) y se registró la falta de dilatación pupilar después de la adecuada instilación de midriáticos, ya que éstos son datos de presencia de ROP grave. Para el presente protocolo se respetaron las prácticas clínicas preferentes del Hospital General de México, en cuanto a los medicamentos utilizados y la frecuencia de los mismos, siempre y cuando se cumpliera con una midriasis adecuada para la realización del tamiz. De igual forma tanto el seguimiento, como el tratamiento de la ROP, en caso de detectarla, siguió los lineamientos establecidos por el servicio de Oftalmología del hospital. La Dra. Zaira del Carmen Bernal Díaz fue la responsable de las revisiones de fondo de ojo con fines de este proyecto, así como de el registro de los hallazgos durante el mismo, hizo sus recomendaciones de seguimiento y tratamiento como experta en el tema, pero no tuvo en ningún momento la decisión terapéutica en sus manos. El seguimiento y tratamiento de los pacientes incluidos en el presente proyecto fueron responsabilidad directa de los encargados de los programas de ROP en el Hospital General de México.

### ***Escala SNAP-PE II***

En el [Anexo V](#) podemos observar que la escala esta construida a partir de variables tanto clínicas como de laboratorio. En los pacientes que se encontraban en la UCIN se recolectaron datos requeridos por la escala del expediente clínico. Con el fin de garantizar el óptimo tratamiento y no incrementar los riesgos para esta población vulnerable; no fueron solicitados estudios de laboratorio con fines exclusivos de investigación, si existía una medición a +/- 3 días de distancia al día de la toma de muestra, éste valor fue tomado para la puntuación de gravedad; Ej. La primera muestra sanguínea con fines de este protocolo se tomó el día 10 de octubre y ese día no se había tomado gasometría para verificar pH, el primer registro de pH disponible tres días previos o posteriores fue tomado para registrar esa variable en la escala.

En el caso de pacientes ambulatorios solo se registró la temperatura corporal, presencia de crisis convulsivas, peso al nacimiento, Apgar a los 5 minutos y pequeño para la edad gestacional de acuerdo a lo estipulado en la escala original. Se aplicó la modificación descrita

por Mattia y deRegnier <sup>39</sup> para registrar puntaje de saturación de oxígeno en casos en los que a pesar de ser paciente ambulatorio tuviera indicado oxígeno suplementario ó bien en pacientes hospitalizados en los que no se disponía de gasometría pero si de oximetría de pulso. Cuando el peor registro de oximetría de pulso marcó > de 90% se dieron 0 puntos, entre 85-90% se asignó 1 punto, entre 75-84% se asignaron 3 puntos, y < de 75% se asignaron 5 puntos. Las demás variables de la escala (presión arterial media, pH y gasto urinario) se registraron en 0.

### ***Transporte, Almacenamiento y Procesamiento de Muestras***

Las muestras obtenidas fueron conservadas en frío y transportadas al Instituto Oftalmológico Conde de Valenciana el mismo día en que fueron obtenidas. Una vez en esta institución todos los procedimientos se realizaron en el laboratorio de investigación teniendo como colaborador principal al QFB. Mariana Ortiz Casas. Cada muestra se centrifugó para obtener suero. El suero obtenido fue alicuotado y etiquetado nuevamente para su conservación a -70 ° C. Cada frasco fue etiquetado con número de identificación exclusivo de cada sujeto y con la leyenda “A”, “B” ó “C” para identificar las tomas realizadas en la primera, segunda y cuarta semana de vida..

Una vez concluida la fase de reclutamiento y seguimiento, se procesaron todas las muestras mediante el kit Quantikine® ELISA Human VEGF y Quantikine® ELISA Human PIGF de R&D systems. Se realizó una serie de diluciones estandarizadas, con los insumos incluidos en el kit y se colocaron muestras por duplicado de cada sujeto y cada momento en orden cronológico con un mapa de identificación como lo sugiere el fabricante; la colocación de muestras y los tiempos de incubación se realizaron con apego a lo estipulado en el instructivo, se determinó la densidad óptica a 450 y 540 nm, para posteriormente realizar la sustracción de ambas mediciones, estandarización de la curva y transformación de los datos a cifras en pg/ml. Todos estos procedimientos se realizaron bajo la supervisión de personal experto en el área.

## PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis univariado con medidas de tendencias central y dispersión para variables cuantitativas y frecuencias relativas para categóricas. Se determinó el coeficiente de asimetría y curtosis demostrando una distribución no normal de los datos.

Las comparaciones entre grupo con ROP y sin ROP, se realizaron con U de Mann Whitney para variables cuantitativas y  $\chi^2$  para variables categóricas. Se calcularon intervalos de confianza de la mediana para las concentraciones séricas de VEGF y PIGF en la semana 1, 2 y 4 para ambos grupos y se contrastaron las concentraciones séricas de VEGF y PIGF en la semana 1, 2 y 4 en sujetos con ROP y sin ROP usando U de Mann Whitney.

Evaluamos la correlación del estado de salud general (SNAP-PE II) sobre los valores séricos de VEGF y PIGF utilizando análisis de correlación de Spearman. Se utilizó la prueba de Skillings Mack para determinar diferencias entre las concentraciones de VEGF, PIGF y conteo plaquetario en los tres tiempos evaluados.

Finalmente se construyó un modelo de análisis de regresión lineal en el que la variable de resultado fueron las concentraciones séricas de VEGF y PIGF en la semana 4 de vida, y se incluyeron la presencia de ROP, las semanas de gestación al nacimiento, el valor de SNAP-PE II en la 4ta semana de vida y las concentraciones séricas de VEGF y PIGF en la semana 1 y 2 como variables independientes.

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

### Riesgo de la Investigación

El volumen sanguíneo necesario para llevar a cabo el protocolo es de 1ml. Las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la toma de muestras sanguíneas en niños establece que éstas no deben exceder entre el 1 y el 5% del volumen circulante diario, por lo tanto nuestras necesidades no excedieron estos límites. De acuerdo a lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación<sup>42</sup> se considera que la toma de muestra sanguínea para el presente protocolo implica un Riesgo Mínimo tomando en cuenta el volumen, ya que no representa más del 2% del volumen circulante de un neonato, bajo ninguna circunstancia. Se requerirá consentimiento informado por escrito en todos los casos.

Se solicitó a la comisión de bioética autorización especial para poder llevar a cabo el estudio con la firma de uno solo de los padres o de el tutor legal del menor, ya que bajo circunstancias especiales como: complicaciones post-parto, madre soltera o madre soltera con incapacidad para dar la autorización; podría no estar disponible la firma de ambos padres; tomando en cuenta que la investigación representaba un riesgo mínimo y no se realizó ninguna intervención, FUE AUTORIZADO con número de registro DI/15/102/03/26 en el Hospital General de México y con la clave HIM2015-012 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. ([Ver Anexo VI](#))

Los participantes en este estudio no recibieron ningún beneficio directo, sin embargo contribuyeron con conocimientos científicos que serán de relevancia para la población vulnerable a la que pertenecen, es decir para los prematuros con riesgo de retinopatía.

### Confidencialidad

La información clínica y las muestras de cada paciente fueron etiquetadas mediante un número identificador único. Los datos personales de identificación tales como apellidos maternos, apellido paterno, fecha de nacimiento y nombre completo en el registro civil, solo fueron de conocimiento del investigador principal y no fueron compartidos en ningún momento, éstos fueron sustituidos por un folio de identificación para hacerlos coincidir con el número asignado a las muestras sanguíneas obtenidas.

Los padres del menor que autorizaron su participación en el proyecto fueron contactados solamente que ellos lo hayan autorizado en el consentimiento informado y solo con fines de completar las revisiones clínicas necesarias para el bienestar ocular del menor o completar las evaluaciones de la investigación.

Toda la información obtenida fue protegida bajo llave por el investigador principal, la información generada de manera electrónica fue resguardada mediante contraseñas de acceso y de igual manera permaneció bajo la custodia del investigador principal durante la duración del estudio.

### **Responsabilidad Médica**

Debido a que la ROP es la principal causa de ceguera en pacientes pediátricos fue responsabilidad de los investigadores informar de la relevancia de las revisiones a los padres, lo cual se realizó en el momento en que se les invitó a participar en el estudio. El Hospital General de México ya contaba con un programa bien establecido para el diagnóstico y tratamiento de la Retinopatía del Prematuro, mismo que no fue modificado con fines de este protocolo.

## CONSIDERACIONES BIOSEGURIDAD

En este proyecto se manejaron muestras sanguíneas de los participantes, a partir de las cuales se extrajo suero y fue almacenado para su posterior procesamiento mediante ELISA . El volumen requerido para cada muestra fue de 1ml y se tomó en microtubos con gel separador BD Microtainer®.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en la mayoría de las ocasiones durante la estancia del menor en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital General de México, mediante el proceso ya estandarizado en la institución, donde se contaba con todo lo necesario para realizar las tomas de acuerdo a lo descrito en la NOM-253-SSA1-2012 y NOM-007-SSA3-2011, así como para el manejo de los desechos que de ello se derivaron, clasificándolos como Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), fueron manejados de acuerdo en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. En caso de no estar hospitalizado, el paciente fue citado en el área de Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, donde el investigador principal fue el responsable de llevar al paciente a toma de muestras por un especialista en pediatría y según los lineamientos de la Norma Oficial.

Las muestras obtenidas fueron etiquetadas con el número de identificación y la fecha de la toma inmediatamente, se transportaron en frío al Instituto Oftalmológico Conde de Valenciana ese mismo día. Fueron sometidas a centrifuga para separar el suero, alicuotadas y almacenadas a -70 ° C. Todos estos procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Investigación. Una vez concluida la fase de recolección de muestras éstas fueron procesadas por Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) en la institución ya mencionada, el procedimiento se realizó con la colaboración de personal experto en el área. El laboratorio de investigación del Instituto Conde de Valenciana fue el responsable del manejo de los residuos peligrosos biológico–infecciosos que se generaron por el procesamiento de éstas muestras.

## RESULTADOS

En el periodo comprendido entre Agosto 2015 y Marzo 2016 se captaron un total de 60 sujetos potencialmente candidatos a ingresar al estudio; se analizaron un total de 36 sujetos, dos de ellos fallecieron después del mes de vida (punto final del estudio), fueron incluidos en el análisis ya que completaron todas las tomas de muestra y la revisión del fondo de ojo en tiempo ([Figura 1](#)).

De los 36 sujetos incluidos en el estudio la relación hombre:mujer fue de 1:1; con una mediana de 32.5 semanas de gestación al nacimiento (rango 26-34.4) y peso al nacimiento de 1300 gramos (rango 780-2100). La [Tabla 1](#) muestra el resto de las características demográficas de la población estudiada.

Catorce sujetos desarrollaron retinopatía del prematuro en algún grado. Tres de éstos sujetos presentaron una variedad asimétrica de la enfermedad, dos de ellos sin datos de retinopatía del prematuro en uno de sus ojos y el tercero solo con vascularización incompleta; el ojo con retinopatía del prematuro de estos casos presentó: estadio 1 en zona II, estadio 1 en zona III y estadio 3 en zona II respectivamente. Enfermedad en zona I solo fue diagnosticada en un sujeto con estadio 3 y sin plus. Enfermedad en zona II se encontró en siete sujetos: tres con estadio 1, uno con estadio 2 y tres sujetos con estadio 3. En zona III se encontraron seis casos, presentando todos ellos estadio 1. Ninguno de los ojos de los sujetos incluidos en esta cohorte presentó enfermedad plus en el momento de la fundoscopia bajo midriasis farmacológica al mes de vida. En cuatro sujetos se diagnosticó retinopatía del prematuro en estadio 3 (neovascularización), todos ellos sin enfermedad plus, uno en zona I y tres en zona II. El servicio de oftalmología decidió la aplicación de tratamiento en 3 casos, el tratamiento realizado fue un antiangiogénico intravítreo en uno o ambos ojos; todas las muestras de sangre en estos casos fueron recolectadas previamente a la aplicación del mismo.

La gravedad medida mediante la escala SNAP-PEII en la semana 1 de vida, fue igual en ambos grupos (mediana = 11 puntos), y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.93$ ). Los valores permanecieron iguales durante la semana 2 de vida con medianas de 12 puntos (ver [Tabla 1](#)), para volver a tener un cambio pero ahora con una mediana sustancialmente mayor en el grupo de sujetos que desarrolló retinopatía (12 puntos vs. 2.5 puntos). Ninguna de las mediciones mostró diferencias significativas para el estado de salud general entre grupo con ROP y sin ROP. Los rangos del puntaje SNAP-PE II fueron más amplios en los sujetos sin retinopatía en las tres mediciones realizadas con valores entre 0 a 60, 0 a 54 y 0 a 50 respectivamente, mientras que el grupo con ROP fueron de 0 a 34 en la semana 1 y 0 a 38 en la semana 2 y 4.

El conteo de plaquetas no mostró valores significativamente diferentes en ambos grupos y las medianas de la cohorte tuvieron tendencia al incremento iniciando con valores de 221 mil, incrementándose a 359 mil en la segunda semana de vida y 324 mil durante la última medición en la semana 4 de vida. ( Ver Tabla 1)

Con respecto a las demás variables recolectadas durante el estudio podemos resaltar que las únicas que mostraron diferencias estadísticas importantes entre grupos fueron las semanas de gestación ( $p=0.03$ ) y el uso de surfactante ( $p=0.03$ ). Si bien el resto de las variables no alcanzaron un valor de  $p < 0.05$ , vale la pena mencionar diferencias clínicamente importantes como días de ventilación mecánica: 4 días en el grupo de ROP y 1.5 días en el grupo sin ROP; así como días de oxígeno suplementario 24 vs 12.5; ambos relacionados con la aparición de retinopatía y estadios avanzados de la enfermedad en la literatura.

La mediana de los niveles séricos de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) en la primera toma (primera semana de vida) fue 789.53 pg/ml. Las concentraciones aumentaron durante la segunda semana de vida (mediana 855.93 pg/ml), para volver a disminuir al mes de vida (mediana 633.37 pg/ml). El comportamiento del VEGF fue distinto en los sujetos con ROP y los sujetos que no presentaron retinopatía, mientras que en los primeros la tendencia fue al incremento entre la semana 1 y 2 y descenso entre la 2 y 4; en los sujetos sin retinopatía hubo una disminución constante sin llegar a diferencias significativas (Ver [Tabla 2](#) y [Figura 2](#)). No se encontraron diferencias significativas al comparar las concentraciones séricas de VEGF en prematuros con retinopatía grave y prematuros con retinopatía sin criterios de tratamiento, en ninguna de las 3 mediciones realizadas ( $p= 0.81, 0.58$  y  $0.69$ ).

Las concentraciones séricas de Factor de Crecimiento Placentario (PIGF) durante la primera semana de vida mostraron una mediana de 37.26 pg/ml; y continuaron aumentando en las mediciones subsiguientes con medianas de 49.6 pg/ml y 60.1 g/ml respectivamente en la totalidad de la cohorte. El comportamiento de la proteína en ambos grupos fue con tendencia a la alza, sin embargo en el grupo de ROP el cambio entre las medianas de las concentraciones a la semana de vida y a los quince días fue de casi 30 pg/ml, mientras que en el grupo que no desarrollo retinopatía del prematuro el incremento en la mediana en éste lapso de tiempo fue de 16 pg/ml ([Figura 3](#)). Al comparar las concentraciones de PIGF en la semana 1 y 2, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupo con ROP y sin ROP ( $p<0.001$  y  $p = 0.03$ ).

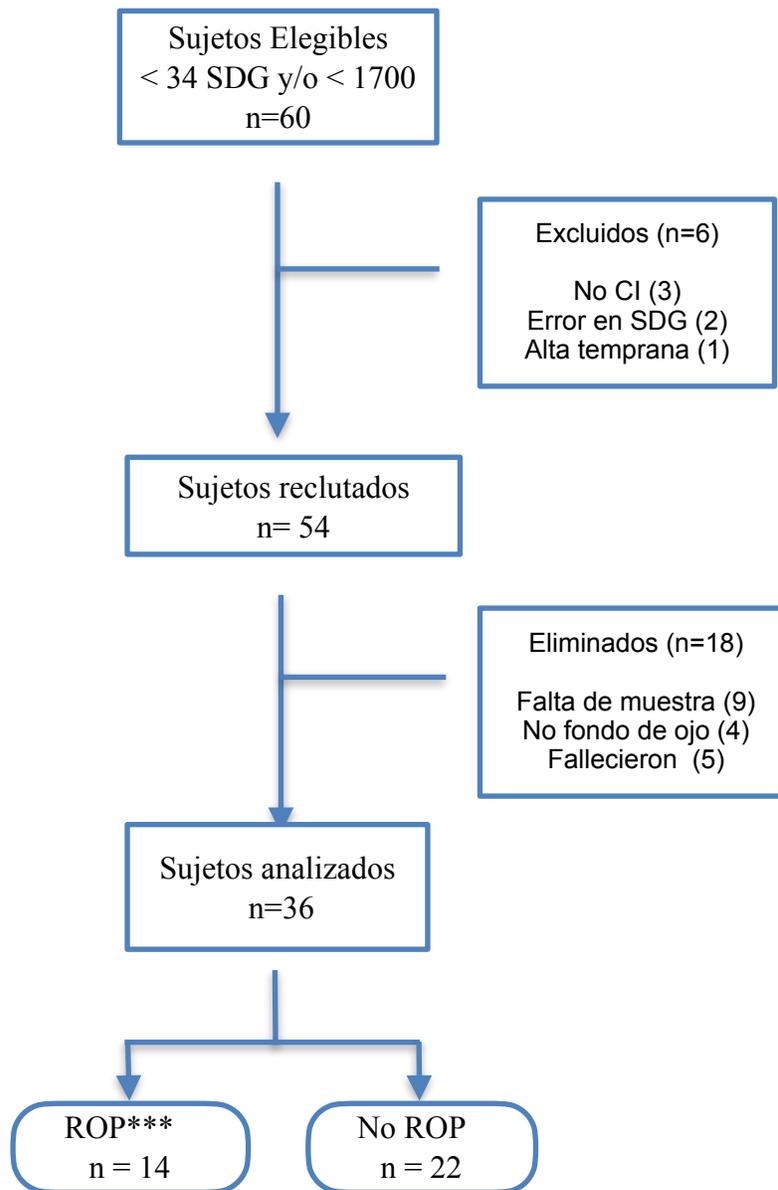
El análisis de correlación de Spearman no mostró asociación entre el estado de salud de los sujetos y las mediciones de VEGF y PIGF en suero durante las semanas 1, 2 y 4. Existe una asociación moderada entre los niveles séricos de VEGF en la semana 1 y las semanas de gestación al nacimiento en el grupo que no desarrollo ROP ( $r_s= 0.67$   $p<0.001$ ) ver [Figura 4](#). La asociación entre las concentraciones séricas de PIGF en la cuarta semana de vida y las

semanas de gestación al nacimiento fue discreta para ambos grupos ( $r_s=-0.57$   $p=0.03$ /  $r_s=-0.47$   $p=0.02$ ). Ver [Figura 5](#).

Los modelos de análisis de regresión lineal fueron construidos con las concentraciones séricas de VEGF y PIGF a la cuarta semana de vida como variable de desenlace y el tener ROP, semanas de gestación al nacimiento, puntaje SNAP-PE II en la cuarta semana de vida y las mediciones a la semana 1 y 2 de las proteínas mencionadas como factores contribuyentes (ver [Tabla 3](#)). El modelo para VEGF muestra que las variables con mayor contribución para esa última medición fueron el tener retinopatía del prematuro y la medición de VEGF en la semana 2. El modelo para PIGF mostró que las únicas variables importantes fueron las dos concentraciones iniciales de la proteína sin importar si se desarrolló o no retinopatía o la gravedad medida por SNAP-PE II durante la 4ta semana de vida.

La prueba de Skillings Mack para los valores de VEGF obtuvo un valor de  $p = 0.06$ , con lo cual concluimos que no podemos establecer con certeza que los valores de VEGF son diferentes entre la semana 1, 2 y 4. La misma prueba aplicada a las concentraciones séricas de PIGF y conteo plaquetario, mostró un valor  $p = 0.0003$  y  $p = 0.0012$  respectivamente, lo cual demuestra que las mediciones en la semana 1, 2 y 4 son diferentes para ambas variables.

FIGURA 1. Selección de población de estudio



\*CI = Consentimiento Informado

\*\* SDG = Semanas de gestación

\*\*\* ROP = Retinopatía del prematuro

**Tabla 1. Características demográficas de la población**

	ROP n = 14	No ROP n = 22	Valor <i>p</i>
Sexo masculino, n (%)	7 (50)	11 (50)	1.0*
Semanas de gestación, $\bar{x}$ (RIC)	32 (30-33)	33.1 (32-34)	<b>0.01**</b>
Peso al nacimiento en gramos, $\bar{x}$ (RIC)	1105 (1010-1300)	1470 (1140-1560)	0.08**
Sepsis	11 (78.5)	13 (59)	0.05*
Transfusiones	8 (57.1)	13 (59)	0.97*
Número de transfusiones $\bar{x}$ (RIC)	1 (0-3)	1.5 (0-3)	0.87**
Ventilación Mecánica, n (%)	10 (71.4)	12 (54.5)	0.13*
Días de ventilación mecánica $\bar{x}$ (RIC)	5.5(1-12)	3.5 (1.5-16.5)	0.24**
CPAP † n (%)	2 (14.3)	4 (18.2)	0.89*
Oxígeno suplementario indirecto n (%)	11 (78.5)	14 (63.6)	0.09*
Días con oxígeno suplementario $\bar{x}$ (RIC)	24 (10-47)	12.5 (2-30)	0.15**
Uso de surfactante n (%)	8 (57.1)	6 (27.2)	<b>0.03*</b>
SNAP-PEII 1a semana, $\bar{x}$ (RIC)	11 (0-17)	11 (0-22)	0.93**
SNAP-PEII 2a semana, $\bar{x}$ (RIC)	12 (0-28)	12 (5-22)	0.94**
SNAP-PEII 4a semana, $\bar{x}$ (RIC)	12 (0-22)	2.5 (0-22)	0.38**
Plaquetas semana 1, $\bar{x}$ (RIC)	221 (99-328)	236.5 (93-329)	0.87**
Plaquetas semana 2, $\bar{x}$ (RIC)	391 (223-446)	315.5 (217-410)	0.36**
Plaquetas semana 4, $\bar{x}$ (RIC)	410 (170-577)	324 (212-447)	0.65**

$\bar{x}$ (RIC)\_ Mediana y Rango intercuartílico

\*\_ Prueba de Chi2

\*\*\_ U de Mann Whitney

†\_ Presión Positiva de la Vía Aérea por siglas en inglés

**Tabla 2. Análisis de comportamiento sérico de proteínas**

	ROP (n = 14) x̄ (IC95%)	No ROP (n = 22) x̄ (IC95%)	Valor p*
VEGF semana 1, pg/ml	518 (268 - 1106)	869 (710 - 1227)	0.27
VEGF semana 2, pg/ml	936 (333 - 1361)	766 (638 - 1329)	0.77
VEGF semana 4, pg/ml	689 ( 435 - 1665)	555 (483 - 764)	0.44
PIGF semana 1, pg/ml	12.26 (4.89 - 22.43)	49.01 (39.45 - 70.24)	<b>&lt;0.001</b>
PIGF semana 2, pg/ml	41.39 (25.84 - 66.92)	65.44 (47.46 - 79.4)	<b>0.03</b>
PIGF semana 4, pg/ml	58.87 (36.17 - 96.3)	77.23 (41.25 - 123.24)	0.44

\* U de Mann Whitney

x̄ (IC95%) \_ medianas (intervalo de confianza 95%)

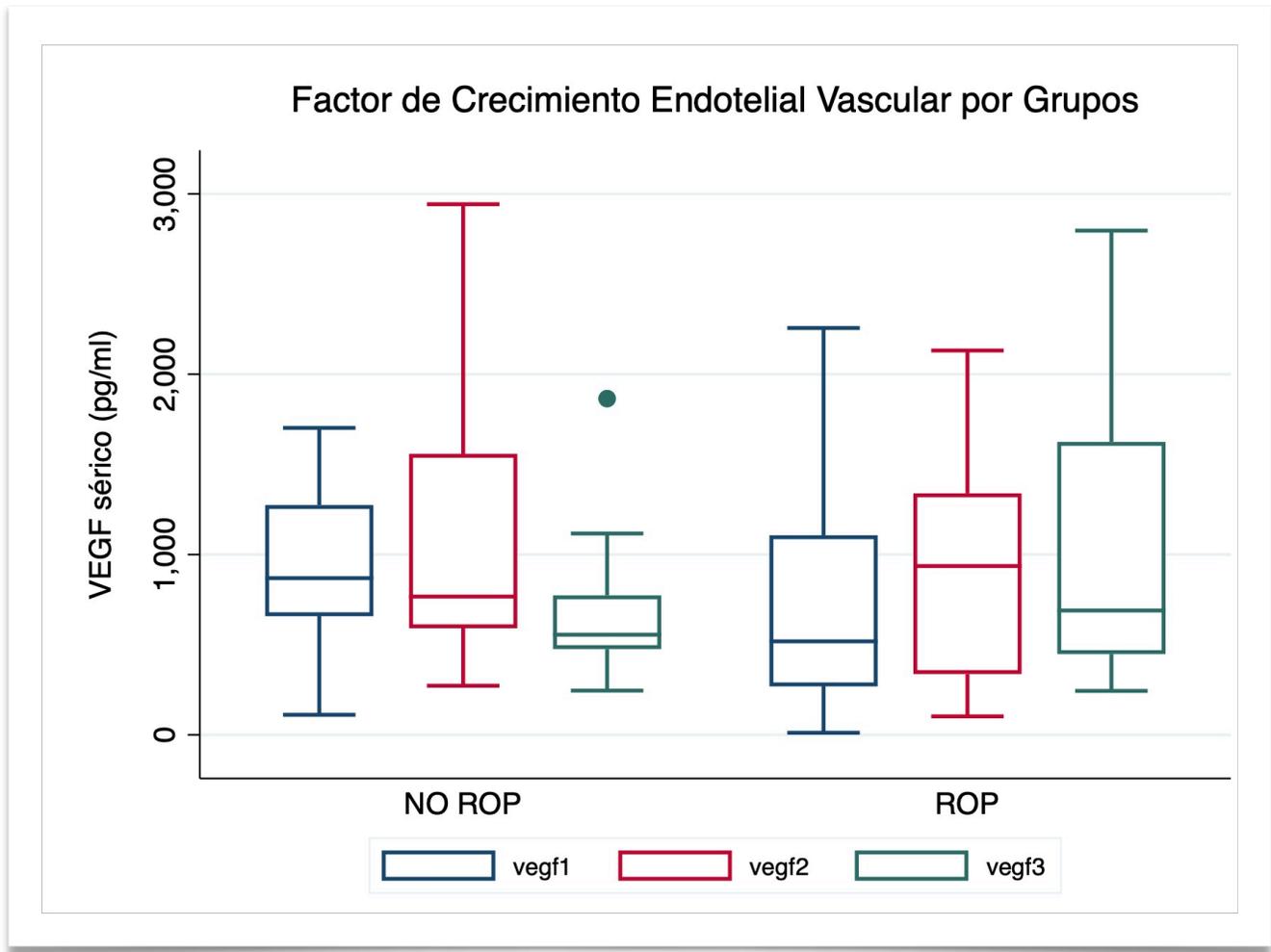
**Tabla 3. Factores relacionados con VEGF y PIGF al mes de vida. Análisis de regresión lineal**

	Coefficientes Estandarizados β	Intervalo de Confianza 95%	Valor p*
<b>VEGF* (pg/ml)</b>			
ROP	0.335	-7.05 - 816.54	<b>0.05</b>
SDG	-0.041	-110.22 - 88.52	0.82
SNAP-PE semana 4	0.108	-9.78 - 18.65	0.52
VEGF semana 1	0.183	-0.19 - 0.60	0.29
VEGF semana 2	0.419	-0.09 - 0.71	<b>0.01</b>
<b>PIGF* pg/ml</b>			
ROP	0.28	-6.28 - 63.03	0.10
SDG	-0.16	-9.59 - 2.45	0.23
SNAP-PE semana 4	0.03	-0.72 - 0.94	0.79
PIGF semana 1	0.67	0.61 - 1.72	<b>&lt;0.0001</b>
PIGF semana 2	0.51	0.29 - 0.83	<b>&lt;0.0001</b>

SDG = semanas de gestación

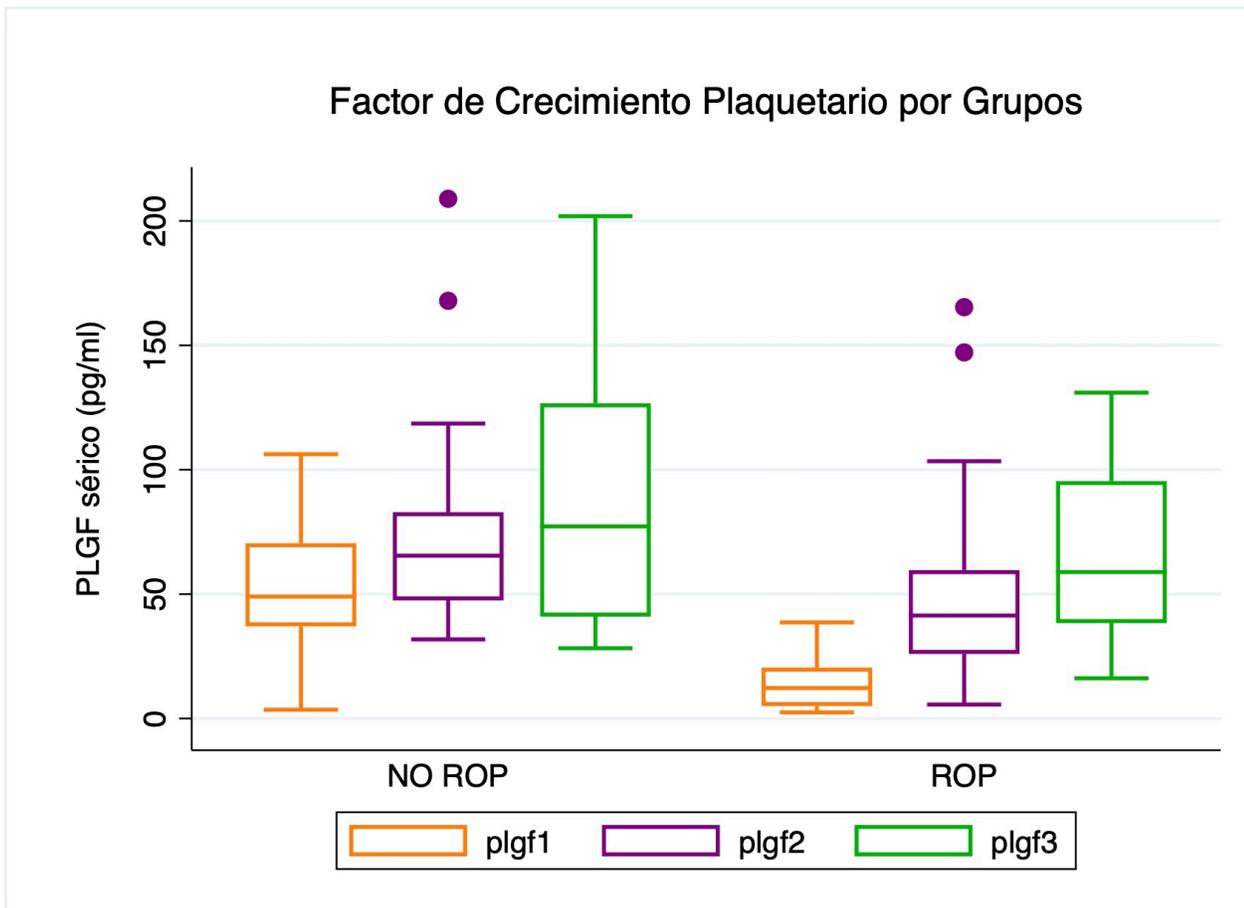
\*VEGF/ PIGF: medición en la semana 4 de vida.

**Figura 2.** Concentraciones séricas de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)



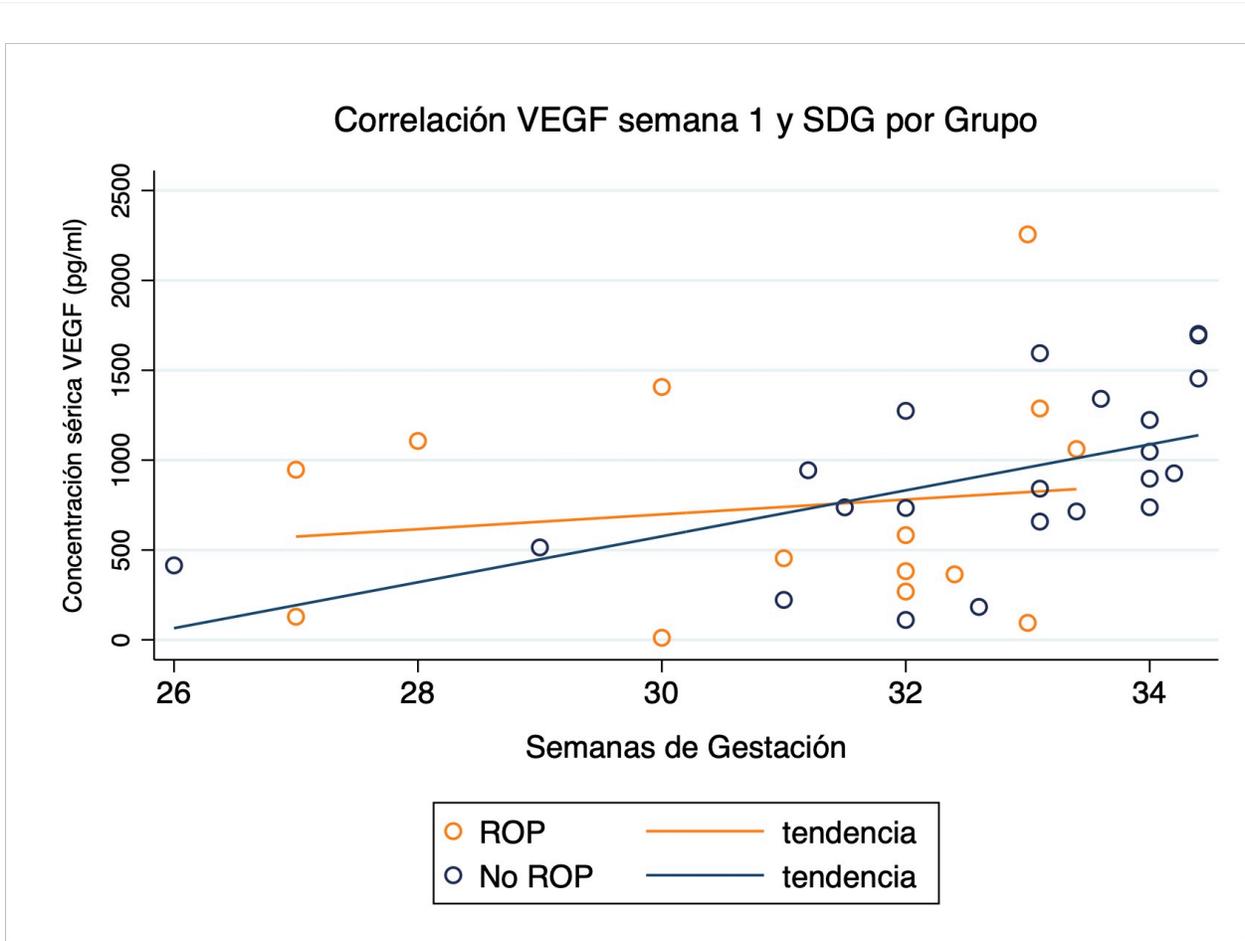
\* vegf1: semana 1; vegf2: semana 2; vegf3: semana 4.

**Figura 3.** Concentraciones séricas de Factor de Crecimiento Placentario (PLGF)

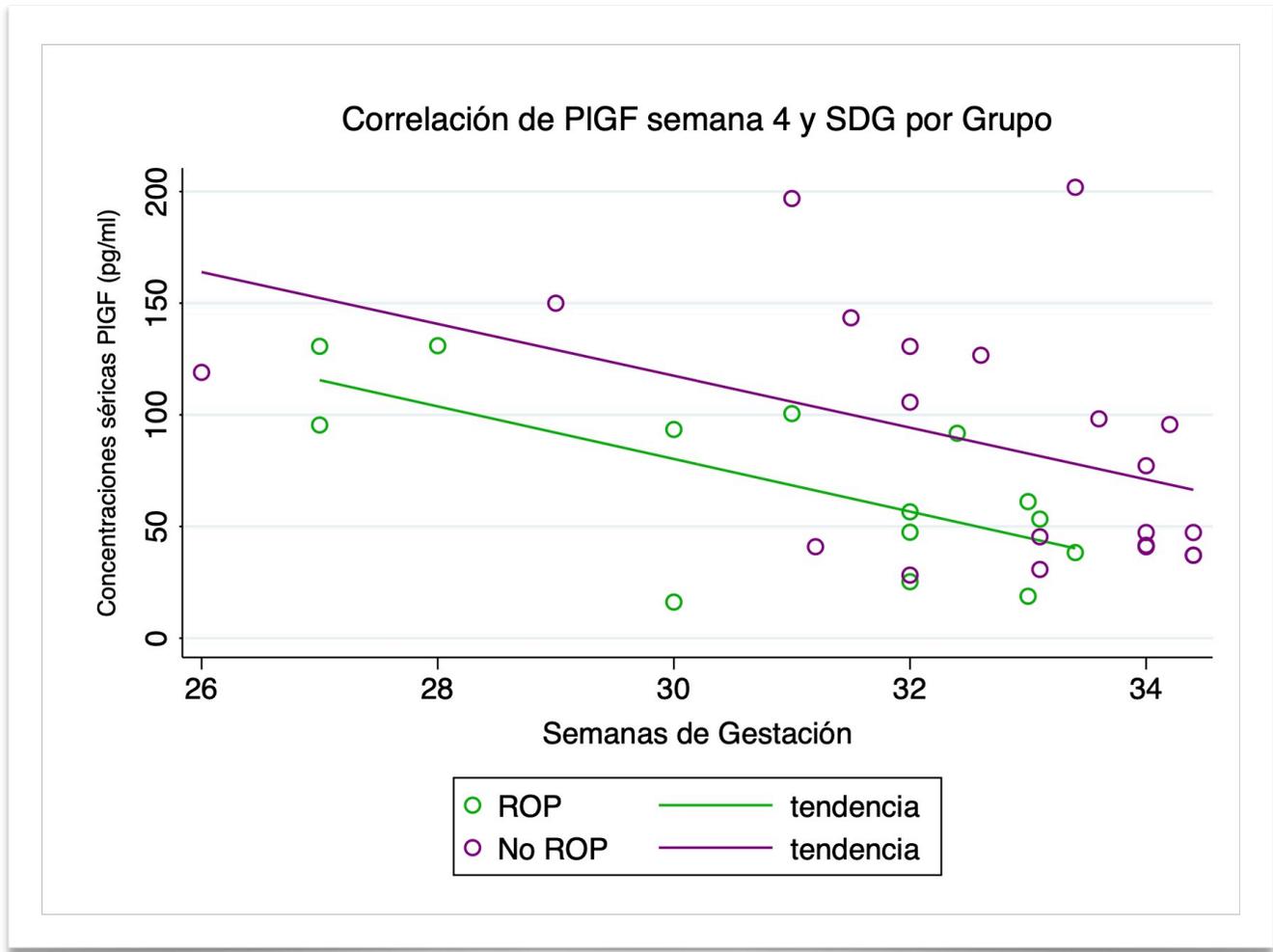


\* plgf1: a la semana de vida; plgf2: a los 15 días de vida; plgf3: al mes de vida

**Figura 4.** Correlación entre Factor de Crecimiento Endotelial Vascular en la semana 1 y las Semanas de Gestación al nacimiento por Grupos



**Figura 5.** Correlación entre Factor de Crecimiento Placentario en la semana 4 y las Semanas de Gestación al nacimiento por Grupos



## DISCUSIÓN

Las concentraciones séricas de VEGF en nuestro estudio contrastan en magnitud con los hallazgos de otros autores como Peirovifar y colaboradores <sup>22</sup>, ellos encontraron en 71 sujetos (30 con ROP y 41 sin ROP) concentraciones de  $267.35 \pm 103.43$  pg/ml de VEGF en el grupo con ROP y  $237.52 \pm 130.92$  pg/ml en el grupo sin ROP, valores considerablemente más bajos que las medianas obtenidas en nuestro estudio en la semana 4 de vida (689 pg/ml en grupo ROP y 555 pg/ml en grupo no ROP); los autores no comentan en su metodología si las mediciones fueron realizadas en plasma o suero, lo cual podría explicar las diferencias en números absolutos. Al igual que ellos no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, su medición de VEGF fue única y realizada entre las semana 6 y 8 de vida, a diferencia de las nuestras realizadas en la semana 1, 2 y 4, lo cual podría ser otra posible explicación para las diferencias de magnitud entre su estudio y el nuestro, la tendencia de la mediciones seriadas durante nuestra investigación fue a la disminución en ambos grupos entre la semana 2 y la 4 lo que podría representar niveles considerablemente menores si hubiéramos prolongado las tomas de sangre hasta empatar las tomadas en el estudio mencionado a la semana 6 u 8 de vida. Si bien el promedio de semanas de gestación al nacimiento de su su estudio fue menor al nuestro ( $28.4 \pm 1.6$  vs 32 en grupo ROP y  $28.8 \pm 1.6$  vs 33.1 grupo no ROP) al igual que el peso al nacimiento ( $1120.0 \pm 196.0$  vs 1105 gramos grupo ROP y  $1189.0 \pm 454.0$  vs 1470 gramos grupo no ROP), no hubo diferencias significativas entre grupos en ambos estudios. Ellos no realizaron análisis para demostrar la contribución de las semanas de gestación sobre las concentraciones de VEGF, sin embargo durante nuestro análisis las semanas de gestación al nacimiento no mostraron ser un contribuyente importante para las concentraciones de VEGF en la semana 4 de vida.

Los resultados de Villegas y colaboradores <sup>21</sup> sin son similares en magnitud a los nuestros (ROP =  $708.30 \pm 287.87$  vs 689 pg/ml / No ROP  $510.81 \pm 150.03$  vs 555 pg/ml), ambos estudios realizamos mediciones en suero de VEGF; sin embargo ellos si encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ROP vs No ROP). La dispersión de los datos en nuestro estudio para las mediciones de VEGF durante la semana 4 (rango intercuartílico 448-1624 pg/ml grupo ROP y 475-773 pg/ml grupo no ROP) sugieren una población más heterogénea, lo cual podría explicar que no encontráramos diferencias entre grupos a pesar de las similitudes de magnitud.

En otros estudios como el de CPieh y colaboradores <sup>43</sup> a pesar de un mayor tamaño de muestra (287 muestras para VEGF) no lograron encontrar diferencias significativas en el comportamiento de VEGF entre el grupo con ROP y sin ella (mediana no ROP 658 pg/ml vs 904 pg/ml ROP); al igual que nosotros hicieron mediciones en distintos momentos en el tiempo de hospitalización de los sujetos, pero sin un calendario establecido, ya que solo les fue autorizada

la toma de sangre residual de las muestras tomadas para otros estudios. Los rangos de valores obtenidos en ambos grupos presentaron una dispersión importante, similar a lo encontrado por nuestro estudio con valores mínimos y máximos de 49 y 2152 pg/ml en grupo no ROP y entre 142–2349 pg/ml para el grupo con ROP durante la semana 32 de edad postmenstrual. La tendencia de las concentraciones de VEGF en ambos grupos fue hacia la disminución entre la semana 32 y 36 de edad postmenstrual, similar a lo encontrado por nosotros entre la semana 2 y 4 de vida para ambos grupos. A pesar de las diferencias en la forma de recolección y la sustancia en que se midieron las concentraciones de VEGF (ellos midieron en plasma), en ambas investigaciones se demuestra la dispersión importante de los valores de VEGF en prematuros y una tendencia a la disminución en sus valores séricos conforme aumenta la edad postmenstrual.

En una serie de 11 casos de sujetos que presentaron ROP con criterios de tratamiento, pudo documentarse una tendencia a la disminución de los niveles séricos de VEGF entre un día previo y 1 semana posterior a la aplicación de láser diodo en retina avascular con una  $p = 0.045$ .<sup>44</sup> Las mediciones de VEGF en plasma también han mostrado una tendencia a la disminución en casos de ROP con criterios de tratamiento, sometidos a láser diodo, independientemente de la zona de la enfermedad y de la lateralidad de la misma.<sup>45</sup> Nuestras cifras mostraron un aumento inicial de VEGF de 518 pg/ml a 936 pg/ml y una disminución posterior a 689 pg/ml en la semana 4 de vida en el grupo que desarrolló ROP; mientras que la tendencia a la disminución fue constante en el grupo sin ROP con medianas de 869, 766 y 555 pg/ml; en ausencia de intervenciones específicas para retinopatía del prematuro y tomando en cuenta que las dos mediciones iniciales representan edades post-menstruales distintas a las publicadas en los trabajos antes mencionados.

Sato y colaboradores <sup>23</sup>, en su estudio de 11 sujetos con ROP grave, muestran las mediciones de VEGF en suero de cinco de ellos previo a la aplicación de antiangiogénico intravítreo (bevacizumab) mostrando valores de: 418, 603, 1140, 2110 y 2660 pg/ml; en las dos mediciones subsecuentes al primer día y una semana post-intervención, los 5 sujetos mostraron disminución de los valores de VEGF en suero hasta llegar a cifras de: 301, 106, 208, 331 y 337 pg/ml respectivamente, igual que lo mostrado por nuestros datos entre la semana 2 y 4 para ambos grupos. Para la semana 2 posterior al tratamiento intravítreo solo reportan concentración de VEGF para 3 sujetos dos de ellos con disminución discreta de los valores y uno con incremento. Todos los sujetos recibieron láser diodo previo a la inyección intravítrea; y aunque mostraron una correlación entre el aumento de los niveles séricos de bevacizumab y la disminución de la concentración sérica de VEGF significativa ( $r = 0.575$ ,  $P = 0.0125$ ), ellos mismos aceptan durante su discusión que los últimos (VEGF en suero) no difieren de las

concentraciones descritas por otros autores en ausencia de bevacizumab en torrente circulatorio.

Existe evidencia científica que demuestra que puede haber modificaciones significativas en las concentraciones de VEGF en plasma de origen genético, la presencia de ciertas variantes en el gen que codifica ésta proteína (936C/T) se relacionan con niveles plasmáticos menores que en los no portadores de dicha variante; media de 9.1 +/- 2.7 pg/ml, en portadores y 28.0 +/- 5.5 pg/ml en no portadores ( $p = 0.033$ ).<sup>46</sup>

Existen estudios que han tratado de predecir ROP de acuerdo a la gravedad de los sujetos en el momento de su nacimiento, midiendo ésta última condición mediante SNAP-PE II encontrando medianas significativamente diferentes (6.0 NoROP vs 15.0 ROP)  $p = 0.001$ ;<sup>47</sup> sin embargo nuestra cohorte se comportó de forma distinta, con medianas iguales en la semana 1 y 2 de vida en ambos grupos (11 y 12 puntos) y con medianas contratantes al mes de vida: 12 puntos para el grupo con ROP y 2.5 para el grupo sin ROP; sin alcanzar valores estadísticamente significativos. Sin embargo no se ha podido establecer ni en este ni en otros trabajos ésta escala de gravedad como un predictor único para retinopatía del prematuro o un contribuyente importante para las modificaciones séricas de VEGF y PIGF.

Con respecto al PIGF en población pediátrica, algunas publicaciones han relacionado ésta proteína con restricción del crecimiento intrauterino y riesgo de parto pretérmino, encontrando valores significativamente menores en el grupo con restricción del crecimiento y con un promedio de edad gestacional al nacimiento menor (33 vs. 38). En los bebés con RCIU el promedio de PIGF sérico en vena umbilical fue de  $1.90 \pm 3.37$  pg/ml, mientras que en el grupo control fue de  $9.32 \pm 6.24$ ;<sup>48</sup> contrastando con nuestras medianas de 58.87 pg/ml para el grupo con ROP y 77.23 pg/ml para el grupo sin ROP. Sin embargo en otras investigaciones sobre farmacocinética se han demostrado concentraciones plasmáticas iniciales de 14.9 pg/ml [mediana (rango), 13.9 pg/ml (9.4–30.3)] e incrementos hasta de diez veces el valor inicial con cifras de 837 pg/ml [mediana (rango): 938 pg/ml (472–987)] posteriores a la administración de Aflibercept sistémico en niños con patología oncológica<sup>49</sup>, lo que sugiere que los tratamientos que bloquean el VEGF pueden inducir la expresión de PIGF en suero.

En cuanto al conteo plaquetario se ha postulado como un factor de riesgo para presentación agresiva de la retinopatía o progresión rápida de la enfermedad, algunos estudios retrospectivos han encontrado diferencias significativas en los conteos plaquetarios de sujetos con ROP vs sujetos con APROP (variedad agresiva posterior de la enfermedad) [ $n=31$ , 10 APROP y 21 controles con ROP] con un valor de  $p < 0.0002$ . En nuestro trabajo no existieron diferencias significativas entre grupos ROP y No ROP en ninguna de las 3 mediciones de los conteos planetarios, ninguno de nuestro sujetos presentó retinopatía agresiva posterior (APROP).<sup>50</sup>

El presente trabajo tiene como limitación importante el reducido tamaño de muestra (n=36) y que no pudo ser completado el ideal planteado al inicio del proyecto, sin embargo otros estudios con tamaños muestrales mayores han tenido resultados similares. La logística necesaria para la realización de éste tipo de proyectos hace difícil el reclutamiento de una muestra grande de sujetos tanto por los recursos económicos y humanos requeridos como por la dificultad en obtener el consentimiento informado de los padres de forma oportuna. Otra limitante importante fue que los datos para la construcción de la escala de SNAP-PE II fueron recolectados de forma retrospectiva ya que se encontraban fraccionados en hojas de enfermería y expediente clínico, el cuál en muchas ocasiones estaba fuera del servicio de cuidados intensivos para la realización de estudios o procedimientos complementarios esenciales para el bienestar de los sujetos.

A pesar de estos contratiempos considero que la información aportada por el presente trabajo de investigación puede ser de utilidad para futuras investigaciones, ya que logramos describir las concentraciones séricas de VEGF y PIGF en prematuros con riesgo de desarrollar ROP pero que no habían recibido intervenciones específicas para ella; por lo tanto abre una ventana de oportunidad para próximas investigaciones sobre los efectos en suero de los medicamentos que bloquean ambas proteínas en el ambiente intraocular.

## CONCLUSIONES

Las concentraciones séricas del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) no son diferentes entre prematuros con retinopatía y sin ella, durante la semana 1, 2 y 4 de vida. En ambos grupos existe una tendencia a la disminución de los niveles séricos entre la semana 2 y 4. El estado de salud del individuo medido con la escala de SNAP-PE II no demostró asociación directa con los niveles séricos de ésta proteína.

Los niveles en suero del PIGF fueron diferentes para los prematuros con ROP y sin ROP en la semanas 1 y 2, además presentaron una tendencia al incremento en ambos grupos durante las tres mediciones. La gravedad de los prematuros (SNAP-PE II) no afectó los valores de PIGF en ninguno de los momentos evaluados.

A pesar de no haber encontrado diferencias significativas en las proteínas evaluadas entre el grupo con ROP y sin ROP, la información obtenida a partir de la presente investigación contribuye a incrementar el conocimiento sobre el comportamiento de VEGF y PIGF en prematuros con riesgo de ceguera (totalidad de la cohorte) aún en ausencia de maniobras específicas para ésta patología. El no haber encontrado en ninguna de las variables recolectadas una contribución a las modificaciones de VEGF y PIGF, más allá de sus propias concentraciones previas, es importante reconsiderar el hecho de que éste comportamiento es parte de un fenómeno complejo que todavía requiere múltiples investigaciones para poder explicarse.

Sería recomendable tomar en cuenta estos resultados al evaluar evidencia que sugiera que el VEGF y PIGF en suero de prematuros pueden modificarse únicamente por la colocación de medicamentos intravítreos que bloquean sus efectos como parte del tratamiento para ROP. Aún cuando ningún sujeto recibió medicamento intravítreo durante el presente estudio, toda la cohorte recibió múltiples maniobras (ventilación mecánica, cirugías, antibióticos de amplio espectro, surfactante, soluciones, alimentación parenteral, transfusiones, etc.) para asegurar su supervivencia y una buena calidad de vida en un futuro cercano, que podrían estar modificando éstas y otras proteínas en suero a través de mecanismos que aún no conocemos con detalle.

## ANEXO II

### Variables del Estudio

Nombre	Instrumento de Medición	Definición		Metodológica mente	Estadísticamente	
		Operacional	Conceptual	Tipo de variable	Cualitativa	Cuantitativa
<b>Niveles séricos de VEGF</b>	ELISA	Concentración en muestra de suero del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular	Picogramos por mililitro de VEGF detectados en suero por ELISA	Dependiente		Continúa (pg/ml)
<b>Niveles séricos de PIGF</b>	ELISA	Concentración en muestra de suero del Factor de Crecimiento Placentario	Picogramos por mililitro de PIGF detectados en suero por ELISA	Dependiente		Continúa (pg/ml)
<b>Retinopatía del Prematuro</b>	Oftalmoscopio indirecto	Cese de vascularización retiniana en prematuro <34 SDG y/o <1750 gramos de peso al nacimiento	Presencia o ausencia de alteraciones retinianas compatibles con ROP	Independiente	Nominal (Si ó No)	
<b>Estado de salud general</b>	Escala SNAPPE II	Escala predicción mortalidad en prematuros graves	Puntaje a la semana de vida, a los 15 días de vida y al mes de vida	Confusora		Discreta (puntos)
<b>Edad gestacional</b>	Calendario	Numero de semanas transcurridas desde a fecundación	Semanas de gestación cumplidas al momento del nacimiento	Descriptiva		Continúa (semanas)
<b>Peso al nacimiento</b>	Báscula	Medida de todos los tejidos corporales	Gramos de peso al nacimiento de un prematuro	Descriptiva		Continúa (gramos)
<b>Oxigenoterapia</b>	Hoja diaria de signos vitales y cuidados de enfermería	Tiempo de administración de oxígeno a concentraciones mayores que las del aire ambiente	Número de días con oxígeno suplementario	Descriptiva	Dicotómica (Si ó No)	Discreta (días)

## Consentimiento Informado



NIVELES SÉRICOS DE VEGF Y PIGF EN NEONATOS PRETÉRMINO Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE RETINOPATÍA DEL PREMATURO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

El Hospital Infantil de México Federico Gómez en trabajo conjunto con el Hospital General de México y en colaboración con el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana estarán realizando un estudio de investigación sobre Retinopatía del Prematuro (ROP), que tiene como propósito conocer mejor el comportamiento de la enfermedad.

La retinopatía del prematuro es una enfermedad que se presenta en niños que nacieron antes de las 34 semanas de gestación o que pesaron menos de 1750 gramos, y puede afectar ambos ojos, causando cambios que pueden o NO requerir tratamiento y de no detectarse a tiempo y tratarse pueden conducir a la ceguera, motivo por el cual es muy importante conocer a fondo la enfermedad. En México la probabilidad de que un niño prematuro tenga la enfermedad es de aproximadamente el 20%.

Al igual que usted otros padres serán invitados a participar en el estudio. Su participación es totalmente voluntaria y se le dará exactamente el mismo trato y manejo a su hijo(a) si decide participar o si decide no hacerlo.

El manejo médico de su hijo(a) no será modificado en ningún momento y las decisiones de tratamiento las tomaran los neonatólogos y demás especialistas involucrados en su atención. Todos los niños participen o no en este proyecto serán revisados de sus ojos aproximadamente 1 mes posterior a su nacimiento. La revisión para saber si tienen o no retinopatía del prematuro consiste en colocar gotas en sus ojos para dilatar la pupila y ver el fondo del ojo con aparatos especiales. Una vez revisado el fondo de ojo dependiendo de lo encontrado se determina si se requiere una nueva revisión, tratamiento o si definitivamente no tiene la enfermedad.

Los procedimientos distintos que se realizaran a los niños(as), cuyos padres autoricen su participación en el estudio, serán **tres (3) tomas de sangre de un volumen de 1 ml cada una, la primera a las 24 horas de su nacimiento, la segunda 2 semanas después y la última al mes de vida**, que generalmente coincidirá con la revisión de fondo de ojo. Con estas muestras de sangre estudiaremos la concentración de dos sustancias específicas llamadas VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) y PIGF (Factor de Crecimiento Placentario) las cuales se cree que contribuyen a la presencia o ausencia de la retinopatía. Además se tomará información de estudios de laboratorio realizados a su hijo durante su estancia en el hospital. Si su hijo es dado de alta antes de la fecha ideal para revisar sus ojos, será citado en el Servicio de Oftalmología del Hospital Infantil Federico Gómez donde se podrá hacer esta evaluación y la toma de muestra sanguínea correspondiente, para lo cual será necesario nos proporcione datos personales para localizarlo.

Las molestias durante las tomas de sangres son mínimas para su hijo(a) y podría tener un moretón



OFTALMOLOGÍA

Dr. Balmis 148

T +52 (55) 5004 3801



residual por algunos días, pero la cantidad de sangre que tomaremos es pequeña y no representan un riesgo para su bebé. La revisión de fondo de ojo puede ser moderadamente dolorosa por los aparatos utilizados, pero se realiza con anestesia en sus ojos, sin embargo por la manipulación necesaria para hacer una revisión detallada puede ser que los ojos queden muy rojos y con un poco de sangre, incluso que salga lagrime roja, esto es esperado y no es grave, se le entregarán gotas de antibiótico y lubricante, que ayudarán a la mejoría de las molestias y a prevenir infecciones.

Usted no recibirá ningún pago por participar en este estudio, el presente estudio no tiene ningún beneficio directo para usted o su hijo(a), sin embargo ambos podrán contribuir al conocimiento más exacto de una enfermedad que afecta a niños prematuros como lo es la retinopatía. Si usted lo desea podrá ser informado de los resultados obtenidos en de las muestras sanguíneas tomadas a su hijo(a). Podrá contactarnos en el teléfono y correo especificados al final de este documento. En el momento que usted lo desee podrá retirar su consentimiento para participar en el estudio sin que esto genere cambios en el trato que se le de a su hijo(a), exceptuando las maniobras diseñadas con fines exclusivos de investigación (toma de muestras).

Solicitamos su autorización para incluir a su hijo(a) en el estudio y guardar una parte de la muestra de sangre que se le tome, para investigaciones futuras.

- Autorizo TOMA de muestras y CONSERVACIÓN para próximos estudios
- Autorizo SOLO toma de muestras para el presente estudio
- Autorizo se me contacte para toma de muestras o revisiones necesarias para el presente estudio.  
Teléfono: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_
- NO autorizo toma de muestras

a mi hijo(a): \_\_\_\_\_  
(Favor de colocar los apellidos de la madre)

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del Padre

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma de la Madre

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma Testigo 1  
Parentesco con el menor:

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma Testigo 2  
Parentesco con el menor:

**Médico responsable: Dra. Zaira del Bernal Díaz**  
**Dudas: Tel. 044-5533239088. Correo: [dra.zairacbd@gmail.com](mailto:dra.zairacbd@gmail.com)**



**OFTALMOLOGÍA** Dr. Balmis 148 T +52 (55) 5004 3801

Hojas de Recolección de Datos



NIVELES SÉRICOS DE VEGF Y PIGF EN NEONATOS PRETÉRMINO Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE RETINOPATÍA DEL PREMATURO



HOJA DE RECOLECCIÓN

ID.

Datos Personales de Identificación

Apellidos Maternos: RN \_\_\_\_\_

Apellidos Paterno-Materno: RN \_\_\_\_\_

Apellidos Paterno-Materno y Nombre(s): \_\_\_\_\_

No. Expediente: \_\_\_\_\_  HGM  HIMFG

Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Datos Demográficos

Sexo:  F  M

Edad gestacional: \_\_\_\_\_ Peso al nacimiento: \_\_\_\_\_ Apgar 5 min.: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ /1ra EVALUACIÓN

<b>Peso al nacimiento</b>	> 900 g	0 <input type="checkbox"/>	750-999 g	10 <input type="checkbox"/>	< 750 g	17 <input type="checkbox"/>
<b>Presión Arterial Media (PAS – PAD)/3 + PAD</b>			<b>pH más bajo</b>			
Ambulatorio	0	<input type="checkbox"/>	Ambulatorio	0	<input type="checkbox"/>	
20-29 mm Hg	9	<input type="checkbox"/>	> 7.19	0	<input type="checkbox"/>	
< 20 mm Hg	19	<input type="checkbox"/>	7.10 – 7.19	7	<input type="checkbox"/>	
			< 7.10	10	<input type="checkbox"/>	
<b>PO2 / FiO2</b>			<b>Menor temperatura</b>			
Ambulatorio sin O2	0	<input type="checkbox"/>	> 35.6 °C	0	<input type="checkbox"/>	
Ambulatorio con O2			35 – 35.6 °C	8	<input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso > de 90%	0	<input type="checkbox"/>	<35 °C	15	<input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso 85-90 %	1	<input type="checkbox"/>	<b>Gasto Urinario</b>			
Oximetría de pulso 75-84%	3	<input type="checkbox"/>	Ambulatorio	0	<input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso < 75%	5	<input type="checkbox"/>	> 0.9 ml/kg/h	0	<input type="checkbox"/>	
> 2.49	0	<input type="checkbox"/>	0.1 – 0.9 ml/kg/h	5	<input type="checkbox"/>	
1.0 – 2.49	5	<input type="checkbox"/>	<0.1 ml/kg/h	18	<input type="checkbox"/>	
0.33 – 0.99	16	<input type="checkbox"/>	<b>Apgar a los 5 minutos</b>			
< 0.33	28	<input type="checkbox"/>	≥ 7	0	<input type="checkbox"/>	
<b>Crisis Convulsivas Múltiples</b>			< 7	18	<input type="checkbox"/>	
SI <input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	<b>TOTAL:</b>			
<b>Pequeño para la Edad Gestacional (&lt; 3er percentil)</b>						
SI <input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>				
<b>Muestra</b>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	<b>Volumen:</b>	

Médico responsable: Dra. Zaira del Bernal Díaz



NIVELES SÉRICOS DE VEGF Y PIGF EN NEONATOS PRETÉRMINO Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE RETINOPATÍA DEL PREMATURO



Fecha: \_\_\_\_\_ /2da EVALUACIÓN

<b>Peso al nacimiento</b>	> 900 g	0 <input type="checkbox"/>	750-999 g	10 <input type="checkbox"/>	< 750 g	17 <input type="checkbox"/>
<b>Presión Arterial Media (PAS – PAD)/3 + PAD</b>				<b>pH más bajo</b>		
Ambulatorio	0	<input type="checkbox"/>	Ambulatorio	0	<input type="checkbox"/>	
20-29 mm Hg	9	<input type="checkbox"/>	> 7.19	0	<input type="checkbox"/>	
< 20 mm Hg	19	<input type="checkbox"/>	7.10 – 7.19	7	<input type="checkbox"/>	
			< 7.10	10	<input type="checkbox"/>	
<b>PO2 / FiO2</b>				<b>Menor temperatura</b>		
Ambulatorio sin O2	0	<input type="checkbox"/>	> 35.6 °C	0	<input type="checkbox"/>	
Ambulatorio con O2			35 – 35.6 °C	8	<input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso > de 90%	0	<input type="checkbox"/>	<35 °C	15	<input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso 85-90 %	1	<input type="checkbox"/>	<b>Gasto Urinario</b>			
Oximetría de pulso 75-84%	3	<input type="checkbox"/>	Ambulatorio	0	<input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso < 75%	5	<input type="checkbox"/>	> 0.9 ml/kg/h	0	<input type="checkbox"/>	
> 2.49	0	<input type="checkbox"/>	0.1 – 0.9 ml/kg/h	5	<input type="checkbox"/>	
1.0 – 2.49	5	<input type="checkbox"/>	<0.1 ml/kg/h	18	<input type="checkbox"/>	
0.33 – 0.99	16	<input type="checkbox"/>				
< 0.33	28	<input type="checkbox"/>				
<b>Crisis Convulsivas Múltiples</b>				<b>Apgar a los 5 minutos</b>		
SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>	≥ 7	0	<input type="checkbox"/>	
<b>Pequeño para la Edad Gestacional (&lt; 3er percentil)</b>				< 7	18	<input type="checkbox"/>
SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>	<b>TOTAL:</b>			
<b>Muestra</b>	SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>	<b>Volumen:</b>		

Fecha: \_\_\_\_\_ /3ra EVALUACIÓN

Factores de Riesgo:

Sepsis <input type="checkbox"/>	Persistencia Conducto Arterioso <input type="checkbox"/>
Hemorragia Intraventricular <input type="checkbox"/>	Transfusiones <input type="checkbox"/>
Grado I <input type="checkbox"/>	Número: _____
Grado II <input type="checkbox"/>	Fechas: _____
Grado III <input type="checkbox"/>	_____
Grado IV <input type="checkbox"/>	_____
Método de diagnóstico: _____	

Médico responsable: Dra. Zaira del Bernal Díaz



NIVELES SÉRICOS DE VEGF Y PIGF EN NEONATOS PRETÉRMINO Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE RETINOPATÍA DEL PREMATURO



Oxígeno - terapia <input type="checkbox"/>	
Ventilación mecánica <input type="checkbox"/>	Duración de oxígeno – terapia días
CPAP <input type="checkbox"/>	Duración de oxígeno – terapia días
Oxígeno ambiental <input type="checkbox"/>	Duración de oxígeno – terapia días

ROP	Zona	Estadio	Meridianos
SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4a <input type="checkbox"/> 4b <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	Número:  Continuos <input type="checkbox"/> Discontinuos <input type="checkbox"/>
Preumbral tipo I <input type="checkbox"/>		Preumbral tipo II <input type="checkbox"/>	

<b>Peso al nacimiento</b>	> 900 g <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	750-999 g <input type="checkbox"/>	10 <input type="checkbox"/>	< 750 g <input type="checkbox"/>	17 <input type="checkbox"/>
<b>Presión Arterial Media (PAS – PAD)/3 + PAD</b>				<b>pH más bajo</b>		
Ambulatorio	0 <input type="checkbox"/>			Ambulatorio	0 <input type="checkbox"/>	
20-29 mm Hg	9 <input type="checkbox"/>			> 7.19	0 <input type="checkbox"/>	
< 20 mm Hg	19 <input type="checkbox"/>			7.10 – 7.19	7 <input type="checkbox"/>	
				< 7.10	10 <input type="checkbox"/>	
<b>PO2 / FiO2</b>				<b>Menor temperatura</b>		
Ambulatorio sin O2	0 <input type="checkbox"/>			> 35.6 °C	0 <input type="checkbox"/>	
Ambulatorio con O2				35 – 35.6 °C	8 <input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso > de 90%	0 <input type="checkbox"/>			<35 °C	15 <input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso 85-90 %	1 <input type="checkbox"/>			<b>Gasto Urinario</b>		
Oximetría de pulso 75-84%	3 <input type="checkbox"/>			Ambulatorio	0 <input type="checkbox"/>	
Oximetría de pulso < 75%	5 <input type="checkbox"/>			> 0.9 ml/kg/h	0 <input type="checkbox"/>	
> 2.49	0 <input type="checkbox"/>			0.1 – 0.9 ml/kg/h	5 <input type="checkbox"/>	
1.0 – 2.49	5 <input type="checkbox"/>			<0.1 ml/kg/h	18 <input type="checkbox"/>	
0.33 – 0.99	16 <input type="checkbox"/>			<b>Apagar a los 5 minutos</b>		
< 0.33	28 <input type="checkbox"/>			> 7	0 <input type="checkbox"/>	
<b>Crisis Convulsivas Múltiples</b>				> 7	18 <input type="checkbox"/>	
SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>		<b>TOTAL:</b>		
<b>Pequeño para la Edad Gestacional (&lt; 3er percentil)</b>						
SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>				

3  
Médico responsable: Dra. Zaira del Bernal Díaz



NIVELES SÉRICOS DE VEGF Y PIGF EN NEONATOS PRETÉRMINO Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE RETINOPATÍA DEL PREMATURO



<b>Muestra</b>	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	<b>Volumen:</b>
----------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------

	Surfactante <input type="checkbox"/>	Indometacina <input type="checkbox"/>
Numero de aplicaciones		Eritropoyetina <input type="checkbox"/>
Tipo		
Bovino <input type="checkbox"/>		
Porcino <input type="checkbox"/>		
Dosis:		Meningitis <input type="checkbox"/>

Comentarios:

---



---



---



---



---



---

Esquemas:

Médico responsable: Dra. Zaira del Bernal Díaz

<b>Variables</b>	<b>Puntos</b>	<b>Puntaje paciente</b>
<b>Presión arterial media</b>		
20 – 29 mm Hg	9	
< 20 mm Hg	19	
<b>Menor temperatura (la mas baja)</b>		
35 – 35,6	8	
<35	15	
<b>P02 /F02</b>		
1.0 a 2.40	5	
0,33 a 0,99	16	
,0,33	28	
<b>pH más bajo</b>		
7,10 – 7,19	7	
<7,10	16	
<b>Varios episodios de convulsiones (mas de 1)</b>	19	
<b>Diuresis</b>		
0,1 a 0,9 ml /k/min	5	
<0,1ml /k/min	18	

### Adicional SNAPEE II

<b>Peso de nacimiento</b>		
750 – 999	10	
<750	17	
PEG (pequeño para la edad gestacional)	12	
APGAR score < 7 a los 5 min	18	

Documentos aprobación hospitalaria

SALUD  
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL  
GENERAL  
de MÉXICO  
DR. EDUARDO LICEAGA

OF. No. DI/03/191/15

México, D. F., a 11 de junio de 2015

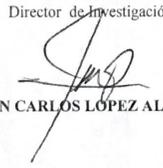
**DRA. MARIA ESTELA ARROYO YLLANES**  
Servicio de Oftalmología  
Presente.

Estimada Dra. Arroyo:

Hago de su conocimiento que la última versión del protocolo titulado "COMPORTAMIENTO DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) Y FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PIGF) EN NEONATOS PRETÉRMINO CON Y SIN RETINOPATÍA DEL PREMATURO" con clave de registro DI/15/102/03/26 así como el consentimiento informado, fueron presentados a los Comités de Ética e Investigación quienes dictaminaron su APROBACION, Por lo tanto, puede dar inicio a su investigación.

Sin más por el momento quedo de Usted.

A la Vanguardia en el Cuidado de la Vida"  
Atentamente  
Director de Investigación

  
DR. JUAN CARLOS LÓPEZ ALVARENGA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO  
**RECIBIDO**  
18 JUN 2015  
NOMBRE ALMA  
HORA 11:00  
OFTALMOLOGIA

JCLA/rtr



DIRECCIÓN DE  
INVESTIGACIÓN  
[www.hgm.salud.gob.mx](http://www.hgm.salud.gob.mx)

Dr. Balmis 148  
Colonia Doctores  
Delegación Cuauhtémoc  
México, DF 06726

T +52 (55) 5004 3842  
Con +52 (55) 2789 2000  
Ext 1164

"2015, AÑO DEL GENERALÍSIMO JOSÉ MARÍA MORELOS Y PAVÓN"

México, D.F., a 3 de marzo de 2015

DG/1000/ 176 /2015

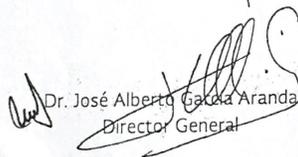
Dr. Marco Antonio Ramírez Ortiz  
Jefe de Oftalmología  
Presente

Informo a usted, que los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad, después de haber revisado su protocolo **HIM 2015-012** "Niveles séricos de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento placentario (PLGF) en neonatos prematuros y su relación con el desarrollo de retinopatía", han emitido el dictamen de:

**APROBADO**

En los términos y condiciones señalados por dichos Comités. Por lo anterior, se autoriza su desarrollo.

Atentamente

  
Dr. José Alberto García Aranda  
Director General

Con copia:  
C.P. Elías Hernández Ramírez. Jefe del Departamento de Control y Gestión a Protocolos de Investigación.  
JAGA/OMH/ISO/ash



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM  
DR. MÁRQUEZ 162, COL. DOCTORES. DEL. CUAUHTÉMOC, C.P. 06720 MÉXICO D.F.  
CONMUTADOR: 5228-9917 EXT. 4315 Y 4100  
[www.himfg.edu.mx](http://www.himfg.edu.mx)

## REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Retinopatía del Prematuro. Guía Clínica Diagnóstica. 1ª edición, Santiago de Chile, 2009.
- <sup>2</sup> Graham E. Retinopathy of prematurity: an epidemic in the making. Review. *Chin Med J* 2010;123(20):2929-2937.
- <sup>3</sup> Gogate P, Gilbert C. Ceguera Infantil: Una perspectiva Mundial. *Salud Ocular Comunitaria*. 2007;2:10-12.
- <sup>4</sup> Cross CW. Cost of preventing retrolental fibroplasia. *Lancet* 1973; 2: 954-956.
- <sup>5</sup> Gilbert CE, Anderton L, Dandona L, Foster A. Prevalence of visual impairment in children: A review of available data. *Ophthalmic Epidemiol*. 1999; 6: 73-82.
- <sup>6</sup> Zimmermann Carrion Juliana. Prevalence of retinopathy of prematurity in Latin America. *Clinical Ophthalmology* 2011; 5: 1687–1695.
- <sup>7</sup> Murat. Frequency, risk factors and outcomes of retinopathy of prematurity in a tertiary care hospital in Turkey. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2013; 55: 467-474.
- <sup>8</sup> Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group: Revised indication for the Treatment of Retinopathy of Prematurity: Results of the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Randomized Trial. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1684-1694.
- <sup>9</sup> Mintz Hittner. Efficacy of Intravitreal Bevacizumab for Stage 3+ Retinopathy of Prematurity. *N Engl J Med* 2011; 364:603-15.
- <sup>10</sup> Yuta Saito. Activated NAD(P)H Oxidase from Supplemental Oxygen Induces Neovascularization Independent of VEGF in Retinopathy of Prematurity Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(4): 1591–1598.
- <sup>11</sup> Guidelines for ROP Screening and Treatment in Latin American Countries. Visión 2020 The Right to Sight. International Agency for the Prevention of Blindness. 2010; 8p.
- <sup>12</sup> 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.
- <sup>13</sup> Andriana I Papaioannou. Clinical implications for Vascular Endothelial Growth Factor in the lung: friend or foe?. *Respiratory Research* 2006; 7:128.
- <sup>14</sup> Hartnett ME. Mechanisms and Management of Retinopathy of Prematurity. *N Engl J Med*. 2012; 367(26): 2515–2526.
- <sup>15</sup> Abhay J. Bhatt. Disrupted Pulmonary Vasculature and Decreased Vascular Endothelial Growth Factor, Flt-1, and TIE-2 in Human Infants Dying with Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 1971–1980.
- <sup>16</sup> Byung Soo Kim. Role of VEGF in kidney development, Microvascular Maintenance and Pathophysiology of renal Disease. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2003; 18: 65-75.
- <sup>17</sup> Sentilhes L. Vascular endothelial growth factor and its high-affinity receptor (VEGFR-2) are highly expressed in the human forebrain and cerebellum during development.. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010; 69(2): 111-28.

- <sup>18</sup> M. Sami El Shimi. Predictive value of vascular endothelial growth factor in preterm neonates with intraventricular haemorrhage. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; 25(9): 1586–1590.
- <sup>19</sup> Budd et. al. Association of retinal vascular endothelial growth factor with avascular retina in a rat model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*. 2010; 128(8): 1014–1021.
- <sup>20</sup> Du J. Changes of serum vascular endothelial growth factor in newborn infants and its relationship with retinopathy of prematurity. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2010; 90(28): 1982 - 5.
- <sup>21</sup> Villegas Becerril E. IGF-I, VEGF Y bFGF, como factores pronósticos de la aparición de la retinopatía de la prematuridad. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2006; 81: 641-646.
- <sup>22</sup> Ali Peirovifar. Vascular endothelial growth factor and insulin-like growth factor-1 in preterm infants with retinopathy of prematurity. *Singapore Med J* 2013; 54(12): 709-712.
- <sup>23</sup> Tatsuhiko Sato, Kazuko Wada, Hitomi Arahori, et al. Serum Concentrations of Bevacizumab (Avastin) and Vascular Endothelial Growth Factor in Infants With Retinopathy of Prematurity. *Am J Ophthalmol* 2012; 153:327–333
- <sup>24</sup> Yalin Imamoglu E, Gunay M, Gursoy T, Imamoglu S, Balci Ekmekci O, Celik G, Karatekin G, Ovali F. Effect of laser photocoagulation on plasma levels of VEGF-A, VEGFR-2, and Tie2 in infants with retinopathy of prematurity. *J AAPOS*. 2014 Oct;18(5):466-70. doi: 10.1016/j.jaapos.2014.07.159. Epub 2014 Sep 27. PMID: 25266828.
- <sup>25</sup> Xiaofeng Yang, Junping Wang & Chao Chen (2020) Serum VEGF and Ang-2 Levels in Infants Before and After Laser Treatment for Retinopathy of Prematurity, *Fetal and Pediatric Pathology*, DOI: [10.1080/15513815.2020.1721625](https://doi.org/10.1080/15513815.2020.1721625)
- <sup>26</sup> Maglione D. *Angiogenesis: Molecular Biology. Clinical Aspects*. Nueva York, 1994.
- <sup>27</sup> Żyła, Monika & Kostrzewa, Marta & Litwińska, Ewelina & Szpakowski, Artur & Wilczynski, Jacek & Stetkiewicz, Tomasz. (2014). The role of angiogenic factors in endometrial cancer. *Menopausal Review*. 2. 122-126. 10.5114/pm.2014.42714.
- <sup>28</sup> Chaballe L. Placental growth factor: a tissue modelling factor with therapeutic potentials in neurology?. *Acta Neurol. Belg*. 2011; 111: 10-17.
- <sup>29</sup> Eli Keshet. Preventing pathological regression of blood vessels. *J. Clin. Invest*. 2003; 112: 27–29.
- <sup>30</sup> Joakim Janér. Placental Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 in Human Lung Development. *Pediatrics*. 2008;122;340
- <sup>31</sup> Timothy L. Jackson. Human Retinal Molecular Weight Exclusion Limit and Estimate of Species Variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 2141–2146.
- <sup>32</sup> Hans C Fledelius, Anders C Christensen. Reappraisal of the human ocular growth curve in fetal life, infancy, and early childhood. *British Journal of Ophthalmology* 1996; 80: 918-921.
- <sup>33</sup> Helen Mactier. Ocular Biometry in Preterm Infants: Implications for Estimation of Retinal Illuminance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49 (1): 453-457.
- <sup>34</sup> Mathews K Thomas. Los Neonatos son Diferentes. Cap. 4. Entendiendo la Anestesia Pediátrica. 2010. Disponible en: [http://www.casa-anestesia.org/site/version/docs/libro\\_ap/chp-4.pdf](http://www.casa-anestesia.org/site/version/docs/libro_ap/chp-4.pdf)

- <sup>35</sup> NEI Clinical Studies [Internet]. Disponible en: <https://www.nei.nih.gov/neitrials/static/study32.asp>
- <sup>36</sup> M O'Keefe, C Kirwan, Diode laser versus cryotherapy in treatment of ROP, *Br J Ophthalmol* 2006;90:402–403.
- <sup>37</sup> Mesquita Mirta, Álvarez Elizabeth, Godoy Laura, Ávalos Sonia. Scores de gravedad SNAP II y SNAP – PE II en la determinación de riesgo de mortalidad neonatal en una unidad de cuidados intensivos polivalente. *Pediatr. (Asunción)* 2011; 38 (2): 93-100.
- <sup>38</sup> J.B. Fortes Filho, J.C. Dill, A. Ishizaki, W.W.S. Aguilar, R.C. Silveira, R.S. Procianoy. Score for Neonatal Acute Physiology and Perinatal Extension II as a Predictor of Retinopathy of Prematurity: Study in 304 Very-Low-Birth-Weight Preterm Infants. *Ophthalmologica* 2009; 223: 177–182.
- <sup>39</sup> Frank R. Mattia and Raye-Ann O. deRegnier. Chronic Physiologic Instability Is Associated With Neurodevelopmental Morbidity at One and Two Years in Extremely Premature Infants. *Pediatrics* 1998;102; e35.
- <sup>40</sup> Wallace DK, Wu KY. Current and future trends in treatment of severe retinopathy of prematurity. *Clin Perinatol.* 2013 Jun;40(2):297-310. doi: 10.1016/j.clp.2013.02.005. PMID: 23719311.
- <sup>41</sup> Chakravorty S, Roberts I. How I manage neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2012 Jan;156(2):155-62. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08892.x. Epub 2011 Sep 27. PMID: 21950766.
- <sup>42</sup> Disponible en: [http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg\\_LGS\\_MIS.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGS_MIS.pdf) Artículo 17 fracción II.
- <sup>43</sup> Pieh C, Agostini H, Buschbeck C, *et al.* VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Tie2 levels in plasma of premature infants: relationship to retinopathy of prematurity. *British Journal of Ophthalmology* 2008;92:689-693.
- <sup>44</sup> Xiaofeng Yang, Junping Wang & Chao Chen (2020) Serum VEGF and Ang-2 Levels in Infants Before and After Laser Treatment for Retinopathy of Prematurity, Fetal and Pediatric Pathology, DOI: 10.1080/15513815.2020.1721625
- <sup>45</sup> Yalin Imamoglu E, Gunay M, Gursoy T, Imamoglu S, Balci Ekmekci O, Celik G, Karatekin G, Ovali F. Effect of laser photocoagulation on plasma levels of VEGF-A, VEGFR-2, and Tie2 in infants with retinopathy of prematurity. *J AAPOS.* 2014 Oct;18(5):466-70. doi: 10.1016/j.jaapos.2014.07.159. Epub 2014 Sep 27. PMID: 25266828.
- <sup>46</sup> Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res.* 2000 Nov-Dec;37(6):443-8. doi: 10.1159/000054076. PMID: 11146397.
- <sup>47</sup> Fortes Filho JB *et al.* Score for Neonatal Acute Physiology and Perinatal Extension II as a predictor of retinopathy of prematurity: study in 304 very-low-birth-weight preterm infants. *Ophthalmologica.* 2009;223(3):177-82. doi: 10.1159/000197114. Epub 2009 Jan 28.
- <sup>48</sup> Wallner W, Sengenberger R, Strick R, Strissel PL, Meurer B, Beckmann MW, Schlembach D. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Clin Sci (Lond).* 2007 Jan;112(1):51-7. doi: 10.1042/CS20060161. PMID: 16928195.

<sup>49</sup> Glade Bender J, Blaney SM, Borinstein S, et al. A phase I trial and pharmacokinetic study of aflibercept (VEGF Trap) in children with refractory solid tumors: a children's oncology group phase I consortium report. *Clin Cancer Res.* 2012;18(18):5081-5089. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0078

<sup>50</sup> Vinekar, A., Hegde, K., Gilbert, C., Braganza, S., Pradeep, M., Shetty, R., & Shetty, K. (2010). Do Platelets Have A Role In The Pathogenesis Of Aggressive Posterior Retinopathy Of Prematurity? *Retina*, 30, S20-S23.