



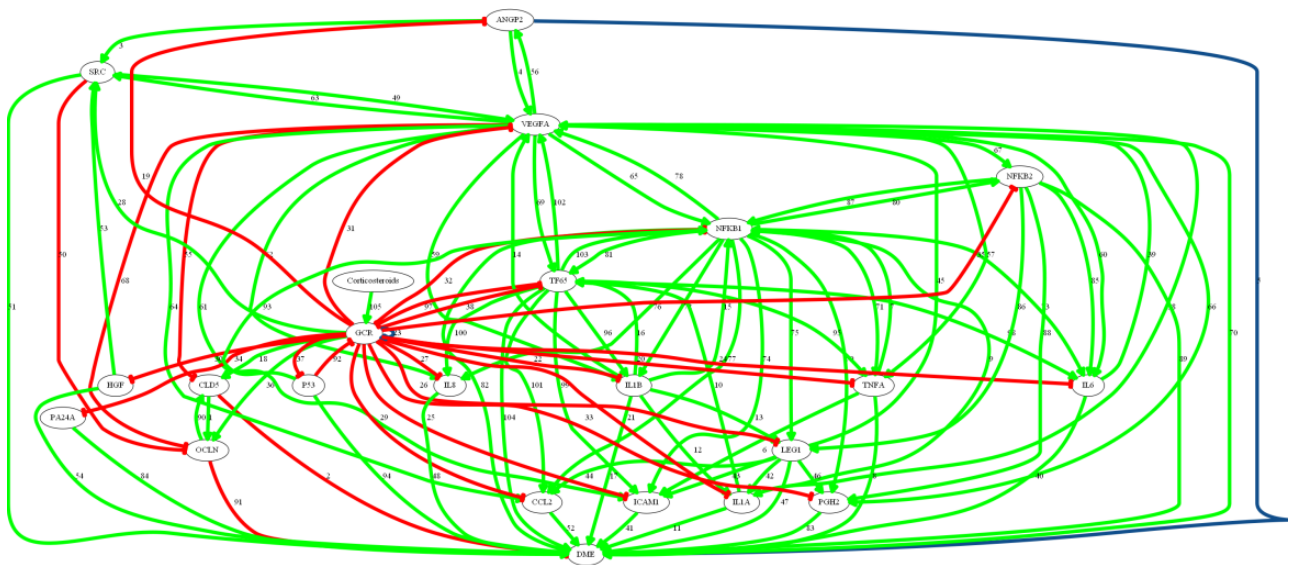
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



ESTUDIO *IN SILICO* DE LOS CORTICOSTEROIDES EN EL EDEMA MACULAR DIABÉTICO

Vitaliy Kogut

TRABAJO DE FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Mecanismo de acción de los corticosteroides

Junio 2021

Tutora acadèmica: Paredes Aguilar, Katihuska Viviana, PhD, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, kathiuska.paredes@urv.cat.

En cooperaci3n con: Anaxomics Biotech SL.

Supervisora: Valls, Raquel, MSc, Senior Project Manager & Team Coordinator, raquel.valls@anaxomics.com.

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo me gustaría expresar gratitud a Morgane Blanot, mi supervisora en la empresa donde realicé mis prácticas (Anaxomics), por haberme guiado durante las practicas además de acompañarme durante la realización de este trabajo.

Me gustaría agradecerle al Dr. Gerard Pujadas Anguiano por sus consejos y por haberme ayudado mucho durante mi búsqueda de prácticas.

Agradecerle también a mi profesor Dr. Ricardo Román Cordero Otero, por todos los consejos dados para enfocar y sacar adelante este trabajo. También quiero agradecerle a mi tutora académica, la Dra. Katihuska Viviana Paredes Aguilar, por ayudarme en la corrección de mi trabajo y por darme consejos.

Por último, me gustaría agradecerle enormemente a toda esa gente que me ha apoyado durante todo este proyecto. Agradecerle a mi familia por haber estado siempre a mi lado apoyándome siempre en los malos momentos y en los buenos, porque sin ellos no hubiera podido salir adelante, a mi pareja, Alexandra Farré, por haberme aguantado durante todos estos días difíciles, por todos sus consejos y sobre todo por llenarme de alegría y felicidad. A todos mis amigos y en especial a los 3 “simios” con los que he estado viviendo durante estos últimos años, los cuales siempre me han apoyado y me han alegrado el día a día.

Gracias a todos porque esto no hubiera podido ser posible sin vuestra ayuda.

ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO	6
2. RESUMEN	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1. Edema Macular Diabético (EMD)	8
3.2. Clasificación del EMD	8
3.3. Incidencia del EMD	9
3.4. Factores de riesgo	9
3.5. Tratamientos	9
3.6. Estudios in silico	10
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS	12
6. METODOLOGÍA.....	13
6.1. Caracterización molecular del EMD	13
6.2. Caracterización molecular de los fármacos	14
6.3. Generación del modelo matemático y representación del mecanismo de acción.....	15
7. RESULTADOS	17
7.1. Caracterización del EMD	17
Motivos causativos (Vías fisiopatológicas).....	18
7.2. Caracterización molecular de los fármacos	23
7.3. Relaciones moleculares entre los corticosteroides y los efectores del EMD.....	26
7.4. Identificación del Mecanismo de Acción (MA)	27
8. DISCUSIÓN	33
9. PERSPECTIVAS DE FUTURO	35
10. CONCLUSIÓN	36
11. AUTOEVALUACIÓN	37
12. BIBLIOGRAFÍA	38

1. DATOS DEL CENTRO

Anaxomics (www.anaxomics.com) es una empresa privada de bioinformática fundada en Barcelona. Esta ofrece una amplia gama de servicios basados en su tecnología Therapeutic Performance Mapping System (TPMS) [1], la cual utiliza los últimos avances en Biología de Sistemas para realizar experimentación virtual y producción de resultados relevantes a un precio reducido y en un corto plazo de tiempo.

El presente proyecto fue realizado en Anaxomics como parte de sus actividades, donde se estudió el mecanismos de acción (MA) de los corticosteroides para el tratamiento del Edema Macular Diabético (EMD). Fue realizado en el departamento de Molecular Health de Anaxomics, donde yo ejercía la función de Project Manager. Durante mi estancia trabajé junto a Morgane Blanot (BSc, Project Manager) bajo la supervisión de Raquel Valls (MSc, Senior Project Manager & Team Coordinator).

2. RESUMEN

Introducción: El número de personas con diabetes ha aumentado considerablemente, siendo una importante causa de insuficiencia renal, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, amputación de los miembros inferiores y de ceguera debido al Edema Macular Diabético (EMD). El EMD es la principal causa de ceguera en adultos de países industrializados. Esta enfermedad está basada en la inflamación, vasculopatía, factores de crecimiento, angiogénesis y neurodegeneración. EMD tiene una amplia selección de tratamientos, siendo los corticosteroides una opción más que interesante. Aprovechando la necesidad de desarrollar los conocimientos sobre los corticosteroides, con el objetivo de fomentar la utilización de los modelos *in silico*, se ha decidido realizar un estudio de los corticosteroides en el EMD mediante herramientas basadas en biología de sistemas.

Metodología: Se utilizó literatura científica de bases de datos oficiales para realizar la caracterización molecular de EMD y de los corticosteroides. Se analizaron 146 artículos científicos para EMD y 158 para los corticosteroides. Además, se utilizó la tecnología TPMS de Anaxomics para simular el tratamiento de los corticosteroides en el contexto de EMD.

Resultados: Se obtuvieron 4 motivos y 135 proteínas efectoras no repetidas para el EMD. Para los corticosteroides se obtuvo una diana terapéutica y 47 proteínas moduladas “downstream” de los fármacos. Finalmente, se obtuvo un mecanismo de acción con el cual se explicaba la acción de los corticosteroides en el EMD con la representación de 21 proteínas.

Conclusiones: Se ha realizado un MA que brinda información sobre la acción de los corticosteroides en el EMD, demostrando así el potencial que presentan los estudios *in silico*.

Keywords: Edema Macular Diabético; Corticosteroides; biología de sistemas; Mecanismo de Acción, modelado *in silico*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Edema Macular Diabético (EMD)

Esta patología es una complicación de la Retinopatía Diabética (RD) y es la principal causa de ceguera en adultos en los países industrializados, siendo una de las principales complicaciones de la diabetes [2].

Aunque la fisiopatología de la enfermedad todavía es incierta, se conoce que ocurre una acumulación de líquido y macromoléculas en el espacio intracelular y/o extracelular de las células oculares dando lugar al edema (Figura 1) [2–4].

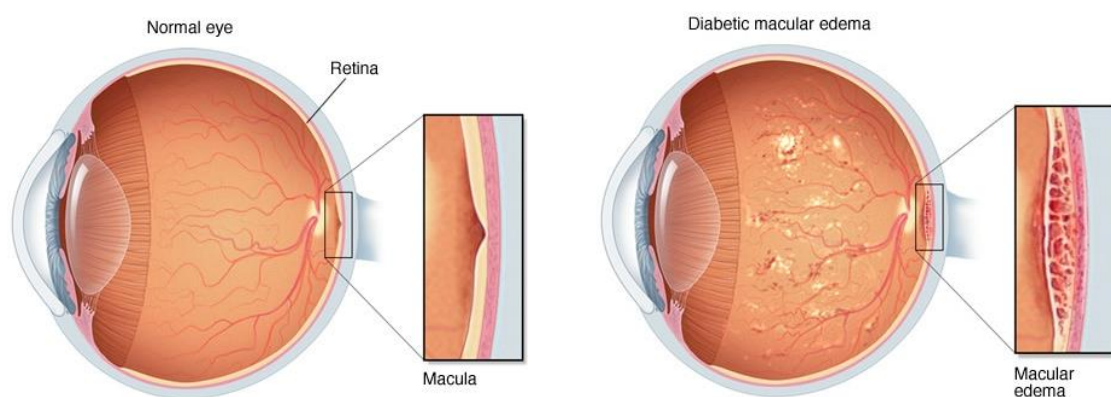


Figura 1. Diferencias morfológicas entre un ojo sano (izquierda) y un ojo con Edema Macular Diabético (derecha) [5].

3.2. Clasificación del EMD

La Clasificación Internacional El International Council of Ophthalmology (ICO) ha definido y clasificado EMD en función de sus características, dividiéndola en los siguientes 3 grupos [6,7]:

- **No EMD**, donde no se presenta engrosamiento retiniano o exudados duros en la región de la mácula [6].
- **EMD no centralizado**, presentando engrosamiento retiniano en la mácula que no implica una zona de subcampo central de 1 mm o más de diámetro [6].
- **EMD que involucra el centro**, se presenta engrosamiento retiniano en la mácula que involucra una zona de subcampo central de 1 mm o más de diámetro [6].

Por otro lado, tras los avances tecnológicos y las consecuentes mejoras de precisión, la clasificación basada en mediciones de tomografía de coherencia óptica (OCT) surge como la favorita de entre los oftalmólogos. [2,8]. OCT divide EMD en 4 tipos principales:

- **Edema macular diabético temprano.**
- **Edema macular diabético simple.**
- **Edema macular diabético cistoide.**
- **Desprendimiento macular seroso.**

3.3. Incidencia del EMD

El EMD es una de las principales complicaciones de la diabetes, enfermedad que se ha llegado a clasificar de epidemia en varios países como Estados Unidos, India y China, debido a su elevada prevalencia entre la población [9,10]. En 2015 en el mundo existían alrededor de 415 millones de pacientes afectados y se estima un aumento para el 2040 alcanzando los 642 millones de personas, conduciendo así a un aumento en RD y EMD [11]. La RD es padecida por el 25,7% de los diabéticos [12] mientras que el EMD ocurre en alrededor del 12% de los pacientes que padecen RD, prevaleciendo así en aproximadamente el 3% de los diabéticos [9,12]. Por otro lado, se ha descrito que la incidencia anual en Europa es de 4,6% en RD y 0,5% en EMD [12].

En España se estima que para el año 2030 haya aproximadamente 3.886 millones de diabéticos, la incidencia de RD y EMD en España es menor respecto Europa, siendo de aproximadamente del 9% y 2,5% respectivamente [13].

3.4. Factores de riesgo

Existen numerosos factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de EMD, pero la diabetes es su principal causa y está fuertemente asociada con la severidad de la retinopatía diabética. La hiperglicemia crónica, la duración de la diabetes y el manejo de la diabetes son factores importantes de riesgo para esta patología. La hipertensión y la dislipidemia también son factores a tener en cuenta en el desarrollo del EMD [14,15].

A su vez, existen factores de riesgo indirectos de los que la relación con el EMD no está todavía clara, entre ellos encontramos la nefropatía, la anemia, la apnea del sueño, las glitazonas y el embarazo [14].

3.5. Tratamientos

En las últimas tres décadas se han desarrollado numerosos tratamientos para el EMD. Durante muchos años el tratamiento de elección fue la fotocoagulación con láser para la prevención de la pérdida de visión secundaria a EMD, debido a que era la única intervención con resultados sólidos [4]. Tras observar que la diabetes aumenta la producción de VEGF, y este lleva a un aumento de la permeabilidad vascular y angiogénesis que desemboca en EMD [4], se siguió otro enfoque para tratar la patología centrado en el bloqueo de VEGF. Hoy en día en el mercado ya existen varios anti-VEGF como Bevacizumab®, Ranibizumab® y Aflibercept® que han sido

aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y por la European Medicines Agency (EMA) para el tratamiento del EMD.

Por otro lado, se determinó que la inflamación juega un importante papel en el EMD, produciendo leucostasis, daño de la barrera hemato-retiniana (BHR) y aparición del edema. Tras esto, los corticosteroides ganaron importancia para el tratamiento de EMD. Los corticosteroides presentan diferentes formas de administración y en los últimos años se ha estudiado la manera de prolongar la retención del fármaco en el ojo con el objetivo de reducir el número de inyecciones. Para ello se han desarrollado implantes oculares de dexametasona (Ozurdex®) o de fluocinolona acetonido (Iluvien®) [4,16].

Actualmente el corticosteroide más utilizado es Ozurdex®, el cual se recomienda en el tratamiento de ojos pseudofáquicos, ojos previamente vitrectomizados y del EMD en los casos en los que las terapias anteriores han fracasado [17,18], demostrando su eficacia como terapia de segunda línea para el EMD persistente [18,19]. Las principales ventajas de Ozurdex® son su alta solubilidad en agua que hace que mejore la carga y biodisponibilidad del fármaco, además de su mayor afinidad de unión en comparación con otros corticosteroides [20].

Iluvien®, está especificado para el tratamiento del EMD en pacientes cuyas terapias previas han fracasado. Ha sido aprobado para el tratamiento de EMD crónico por la FDA y por 17 países europeos incluyendo España [18,21,22].

En conclusión, existen diferentes tipos de tratamientos para el EMD, destacando principalmente los anti-VEGF como los fármacos de primera línea y los corticosteroides como segunda línea [2]. Los anti-VEGF no siempre son efectivos en todos los pacientes, surgiendo así la necesidad de cambiar el tratamiento a los corticosteroides. Los corticosteroides son un tratamiento prometedor debido a su efectividad, su reducido coste y su fácil utilización, y una mejor comprensión de sus vías moleculares podría incitar a los oftalmólogos a utilizarlos como terapia de primera línea [23–25]. Es por esto, que, aprovechando la necesidad de estudiar la acción de los corticosteroides para comprender mejor su funcionamiento, se estudian en este proyecto mediante modelización *in silico* para demostrar su potencial.

3.6. Estudios *in silico*

La biología de sistemas se basa en el estudio de los procesos biológicos, en el que las interacciones que influyen en el desarrollo del proceso se representan con un sistema matemático [26]. Desde su aparición se ha perfilado como un método prometedor el cual es cada vez más utilizado en funciones como comprender mecanismos moleculares de

enfermedades como el asma, la diabetes y el cáncer entre otros [27], así como para estudiar los efectos moleculares de un fármaco en un contexto específico [1].

Los estudios *in silico* proporcionan beneficios como una primera visión de un tratamiento, reducido coste, evitan la utilización innecesaria o excesiva de animales y requieren poco tiempo [28,29]. Asimismo, son basados en humanos y no animales, lo que permite una mejor simulación de lo que pasaría en un ser humano [28].

La tecnología TPMS es un enfoque de biología de sistemas basado en la simulación de redes de interacción proteína-proteína que nos permite estudiar los mecanismos de acción que podrían existir entre un fármaco y un entorno específico [1]. Se basa en modelos de inteligencia artificial y reconocimiento de patrones que integran todo el conocimiento biológico, farmacológico y médico disponible de repositorios públicos para crear modelos matemáticos que simulan *in silico* el comportamiento de la fisiología humana. La tecnología TPMS traza los caminos más probables que conducen un estímulo (fármaco) a una respuesta (enfermedad) a través de la red biológica de proteínas humanas, identificado el conjunto de posibles MA que muestran una respuesta fisiológica cuando el sistema es estimulado de forma específica. Al realizar la representación gráfica del MA, solo se representan las rutas con mayor relevancia [1,27,30]. Esta tecnología ha sido utilizada con gran éxito en diferentes estudios, mostrando su eficacia en evaluar los efectos adversos de la combinación de fármacos sacubitril/valsartan en el tratamiento de los fallos cardíacos [1] y en la identificación de alteraciones del proteoma en el desarrollo de la diabetes tipo 2 [31], entre otros.

Por lo tanto, se utilizó la tecnología TPMS para estudiar los corticosteroides Ozurdex® e Iluvien® en el EMD, aumentando el conocimiento sobre los corticosteroides mediante la identificación y comprensión de su MA, con el objetivo de investigar la función de los corticosteroides al igual que demostrar que los estudios *in silico* son un método efectivo y con gran potencial, fomentando así su utilización.

4. HIPÓTESIS

La predicción de MA mediante modelos *in silico* simula la respuesta de los corticosteroides en el EMD.

5. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es representar y analizar el tratamiento del EMD con los corticosteroides Ozurdex® e Iluvien® mediante modelización *in silico*. Para ello se desarrollaron los siguientes objetivos secundarios:

- Recopilar información del EMD y generar un modelo que represente la fisiopatología del EMD, creando así un “humano” que padece la patología.
- Recopilar información molecular para simular la acción de los corticosteroides.
- Tratar el modelo con los corticosteroides y explicar, analizar y contextualizar el mecanismo de acción por el cual los corticosteroides tratan el EMD.

6. METODOLOGÍA

El proyecto se organizó en 3 partes, donde se comenzó recopilando información para luego introducirla en el modelo y entrenarlo con el objetivo de obtener los mecanismos de acción (Figura 2).

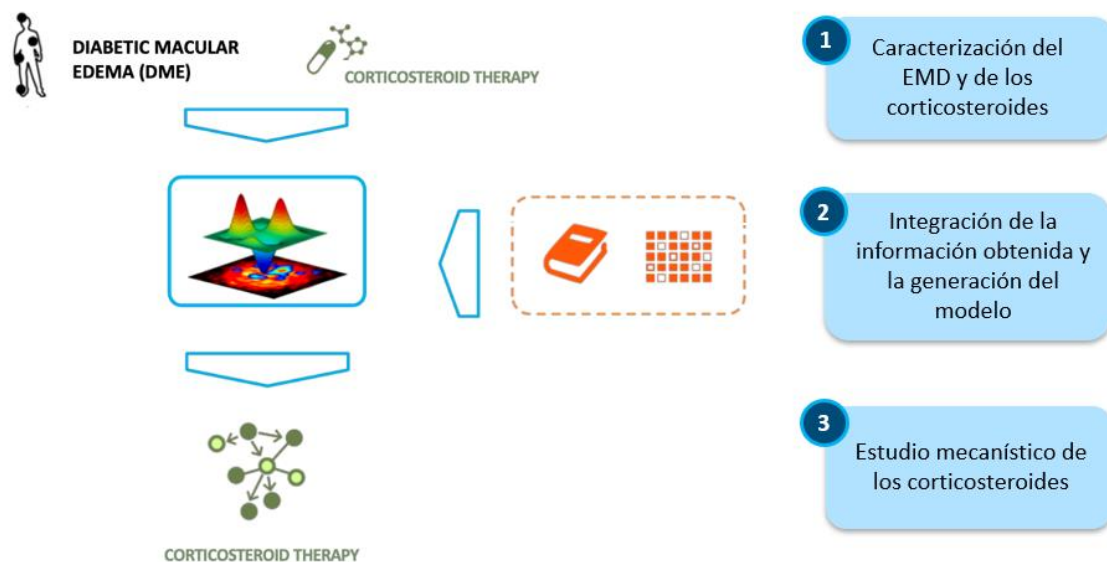


Figura 2. Esquema resumen de la metodología realizada.

6.1. Caracterización molecular del EMD.

Se realizó mediante la identificación de las principales vías y procesos (“motivos”) alterados en la patología y la identificación de proteínas implicadas en el desarrollo de la patología (“proteínas efectoras”). El EMD fue caracterizado molecularmente a través de revisiones de literatura científica reunida sobre el tema. La información que se encontró se utilizó para la construcción de la red de proteínas de la enfermedad y en la generación de los mecanismos de acción. Para esta caracterización se siguieron una serie de pasos.

Se empezó realizando una búsqueda sistemática sobre la patogénesis molecular y la fisiopatología de la afección en bases de datos como PubMed {<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>}. Para realizar la búsqueda se utilizaron palabras clave para una mejor identificación y selección de artículos.

- (“diabetic macular edema”[Title] OR “diabetic macular oedema”[Title] OR “DME”[Title]) AND (“molecular”[Title/Abstract] OR “pathophysiology”[Title/Abstract] OR “pathogenesis”[Title/Abstract])

La búsqueda se realizó el día 23 de diciembre de 2020 y se obtuvieron 146 resultados de los últimos 13 años.

La literatura científica se revisó a nivel de títulos y resúmenes y, si se encontraba información molecular que describiera la fisiopatología, se revisaban los artículos minuciosamente identificando procesos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad. Estos procesos se denominan “motivos” y se clasificaron en dos niveles, según su implicación en la enfermedad:

- **Causativos (C):** motivos que están relacionados directamente con el inicio o fisiopatología de la enfermedad caracterizada.
- **Manifestativo (M):** motivos que son consecuencia de la patología.

Cada proceso fisiopatológico se caracterizó más a fondo a nivel de proteínas. Las publicaciones que se reunieron anteriormente se revisaron con el objetivo de identificar proteínas cuya actividad o ausencia está funcionalmente asociada con el desarrollo de la enfermedad.

En el caso de obtener una evidencia que se consideraba que no era lo suficientemente consistente para justificar su participación en la patología, se realizaba una búsqueda adicional en específica incluyendo todos los nombres de la proteína según UniProtKB, al igual que todos los nombres de la patología (e.g.: ("diabetic macular edema" [Title] OR "dme" [Title] OR "diabetic macular oedema" [Title] OR "dmo" [Title]) AND ("Interleukin-1 beta" [TITLE/ABSTRACT]) OR "IL1B" [TITLE/ABSTRACT] OR "IL-1 beta" [TITLE/ABSTRACT] OR "Catabolin" [TITLE/ABSTRACT] OR "IL1F2" [TITLE/ABSTRACT]). En el caso de identificar nuevos candidatos en esta fase, se incluían como efectores. Toda esta información fue recogida en un archivo Excel.

6.2. Caracterización molecular de los fármacos

La caracterización de Ozurdex® e Iluvien® se realizó mediante una búsqueda en los documentos oficiales de cada fármaco de interés en fuentes como European Medicines Agency (EMA) (<https://www.ema.europa.eu/en>) y Food and Drug Administration (FDA) (<https://www.fda.gov/>), además de la identificación del Product Monograph. Una vez se obtuvieron los documentos oficiales, se realizó una revisión identificando información como dianas terapéuticas y efectos “downstream” (proteínas cuya actividad o expresión se modifica debido al efecto del fármaco, no son un objetivo directo del fármaco).

Posteriormente, se utilizaron bases de datos especializadas para la búsqueda de información de dianas terapéuticas tales como DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>), Stitch (<http://stitch.embl.de/>) y Supertarget (<http://insilico.charite.de/supertarget/>).

Tras la revisión y recopilación de datos de las bases mencionadas, se continuó realizando una búsqueda sistemática de literatura en PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

La búsqueda fue realizada el 2 de febrero de 2021 y se identificaron revisiones publicadas recientemente sobre dianas conocidas y efectos “downstream” de los fármacos de interés. Las búsquedas específicas realizadas fueron las siguientes:

- **Para Dexametasona:** (Dexamethasone[Title/Abstract] OR ozurdex[Title/Abstract]) AND (molecular[Title/Abstract] OR mechanism[Title/Abstract] OR target[Title/Abstract] OR effect[Title/Abstract] OR action[Title/Abstract]) AND (“diabetic macular oedema”[Title/Abstract] OR DME[Title/Abstract] OR “diabetic macular edema”[Title/Abstract] OR "macular edema"[Title/Abstract]), obteniendo 120 resultados de los 5 últimos años.
- **Para Fluocinolone:** ("Fluocinolone acetonide"[Title/Abstract] OR iluvien[Title/Abstract] OR Fluocinolone[Title/Abstract]) AND (molecular[Title/Abstract] OR mechanism[Title/Abstract] OR target[Title/Abstract] OR effect[Title/Abstract] OR action[Title/Abstract]) AND (“diabetic macular oedema”[Title/Abstract] OR DME[Title/Abstract] OR “diabetic macular edema”[Title/Abstract] OR "macular edema"[Title/Abstract]), obteniendo 38 resultados de los últimos 10 años. Se realizó en los últimos 10 años debido a la escasez de artículos en los últimos 5 años.

Los artículos obtenidos se evaluaron a nivel de título y resumen, si se encontraba información molecular, los artículos se revisaban detenidamente para identificar proteínas / genes candidatos a ser diana o efecto “downstream. Si para la evidencia de una posible diana o efecto “downstream se consideraba que no era lo suficientemente consistente como para ser asignada como tal, se realizaba una búsqueda adicional en PubMed específicamente para el candidato. En esta búsqueda se incluían todos los nombres tanto del fármaco como de las proteínas según UniProtKB, (e.g. (Dexamethasone[Title/Abstract] OR ozurdex[Title/Abstract]) AND (“CCL2” OR “MCP1” OR “MCP-1” OR “SCYA2” OR “C-C motif chemokine 2” OR “Monocyte chemoattractant protein 1” OR “Monocyte chemoattractant protein-1”)). Los nuevos candidatos identificados en esta búsqueda se añadían siguiendo los mismos criterios. Toda esta información fue recogida en un archivo Excel.

6.3. Generación del modelo matemático y representación del mecanismo de acción

En la segunda parte, se integró la información compilada de la enfermedad y de los fármacos generándose así un modelo. Por otro lado, se reunió e integró información acerca de las

funciones de las dianas y efectos “downstream” relevantes para el fármaco, para asegurar que el modelo contenía toda la información relevante para simular la patología de interés.

Para la generación del modelo matemático se analizaron los enlaces alrededor de los efectores proteicos recopilados durante la caracterización de la patología, revisando que las proteínas incluidas tuvieran enlaces con el resto de la red proteica del sistema. Para aquellas proteínas que no estaban correctamente ligadas, se procedió a completar la información por medio de búsquedas en la literatura científica. A su vez, se generó un mapa de interacciones para la diana terapéutica y ciertos efectos downstream de interés, y mediante la revisión de literatura, se definieron sus funciones principales y contextualizadas con la patología. Toda esta información se empleó como restricciones para el cálculo del modelo.

Finalmente, se integró toda la información generada tanto de las proteínas de la patología, dianas e información mecanística de los fármacos además de restricciones constituidas por los enlaces proteicos adicionales en el sistema con la información ya presente en el sistema para generar un modelo matemático que represente la fisiopatología del EMD y su tratamiento con corticosteroides.

El modelo realizó una serie de predicciones produciendo un MA, el cual fue validado. El proceso de validación consistió en revisar y corregir las relaciones proteicas calculadas por el modelo. Para ello, se revisaron manualmente los enlaces generados: para cada enlace de la tanda, primero se revisaba si el enlace constaba en la base de datos de Anaxomics, en caso afirmativo, quedaba validado. En el caso contrario, se procedía a buscar en literatura, contextualizando el enlace en la patología estudiada, EMD. En caso de encontrar relación en literatura científica, quedaba validado y en caso contrario se procedía a la eliminación de este.

Una vez terminada la revisión de cada tanda de enlaces, se integraron las nuevas restricciones en el modelo y se recalcularon para generar un nuevo MA. Este se volvió a revisar para comprobar su validez, hasta obtener la versión definitiva.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización del EMD

Tras la revisión de la literatura científica, se definieron 4 motivos diferentes para describir la fisiopatología del EMD, además de un total de 135 efectores no duplicados identificados (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los motivos relacionados con el EMD

TIPO DE MOTIVO	MOTIVO	NÚMERO DE PROTEÍNAS
Causativo	Estrés oxidativo	18
	Inflamación	33
	Alteración de la Barrera hemato-retiniana y aumento de la permeabilidad vascular	83
	Angiogénesis	38

Lo efectores de EMD recopilados fueron integrados en la base de datos de ANAXOMICS, que nos proporcionó un listado de interactores directos de los efectores que fueron representados en una Network (Figura 3). Además, la Figura 3 muestra como numerosas proteínas efectoras tienen función en varios motivos. Podemos observar que la tecnología TPMS, además de tener en cuenta las proteínas efectoras de la patología, también tiene en cuenta los interactores directos de estas, que identifica a través de la base de datos de ANAXOMICS. Por lo que se identificaron un total de 11432 interacciones entre 2916 proteínas, de las cuales 135 son los efectores identificados durante la caracterización (Figura 3).

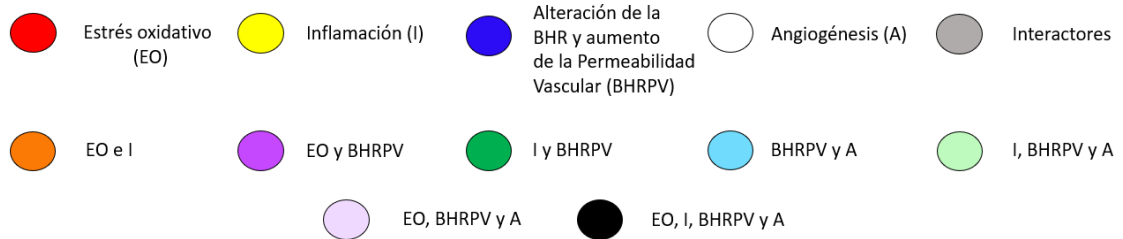
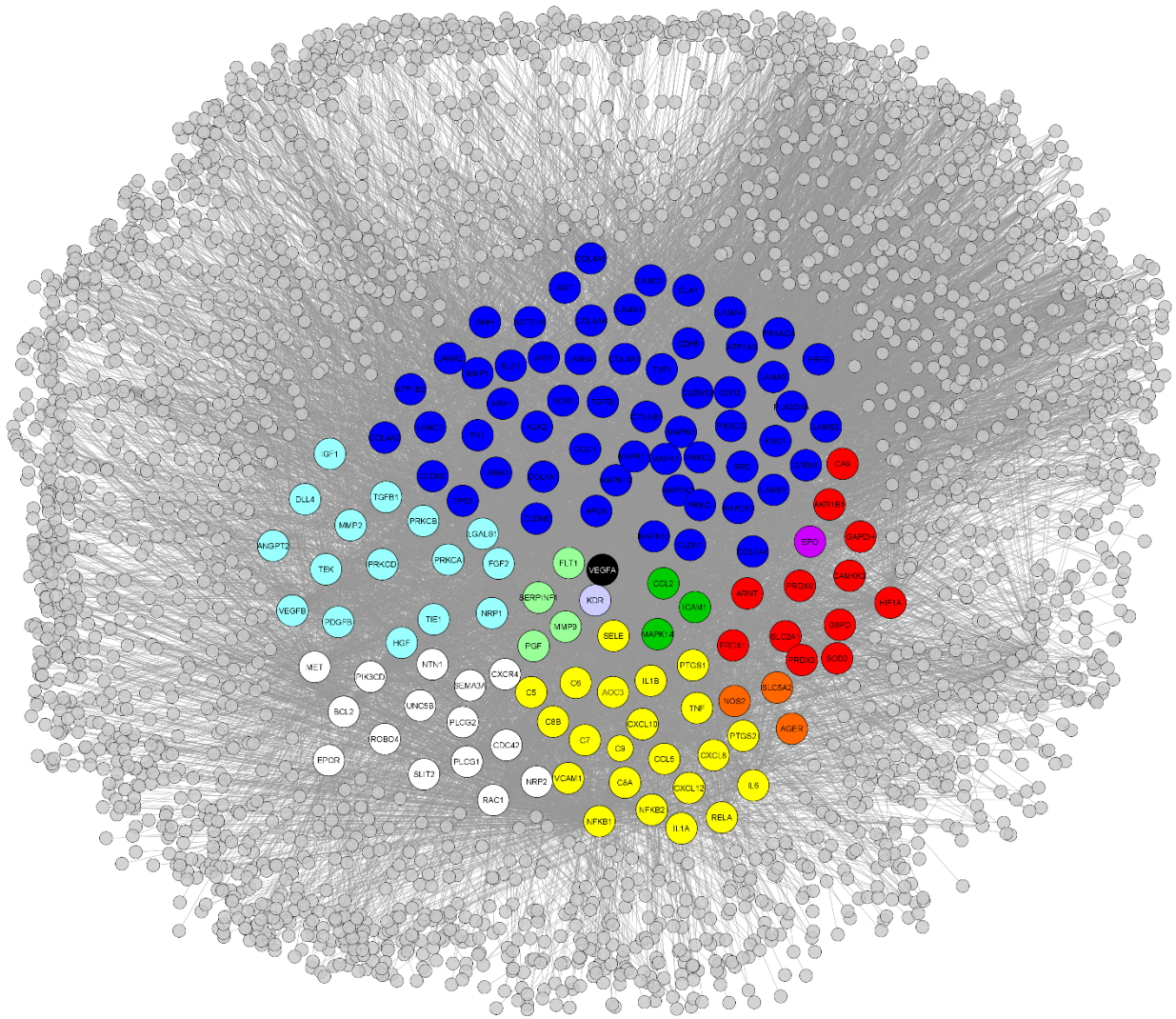


Figura 3. Interactoma de la patología. Cada proteína fue clasificada en función como efectora o interactora. En el caso de ser efectora fue clasificada en función de los motivos a los cuales pertenecía.

Motivos causativos (Vías fisiopatológicas)

Como se ha comentado, el EMD es una patología multifactorial y compleja caracterizada por alteraciones en la tensión oxigénica y el estrés oncótico e hidrostático. Mientras que molecularmente se caracteriza por una interacción entre estrés oxidativo (motivo 1),

inflamación (motivo 2), degradación de BHR y aumento de la permeabilidad (motivo 3) y activación de la angiogénesis (motivo 4) conduciendo a fugas (motivos 3 y 4) (Figura 4) [15,32].

La hiperglicemia activa vías bioquímicas que llevan al estrés oxidativo y producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Motivo 1). Seguidamente, el estrés oxidativo activa la producción de diferentes citoquinas, quimiocinas, moléculas adhesivas, moléculas del complemento y prostaglandinas aumentando así la inflamación (motivo 2). Todas estas moléculas provocan la ruptura de la unión de las células endoteliales, la pérdida de pericitos, el engrosamiento de la membrana basal de la retina, dando como resultado un aumento de la permeabilidad vascular que desemboca en BHR y en consecuencia en EMD (motivo 3). Con la activación de estos procesos, se inducen efectores angiogénicos que colaboran afectando las estructuras vasculares promoviendo la progresión de EMD (motivo 4) (Figura 4) [15,32,33].

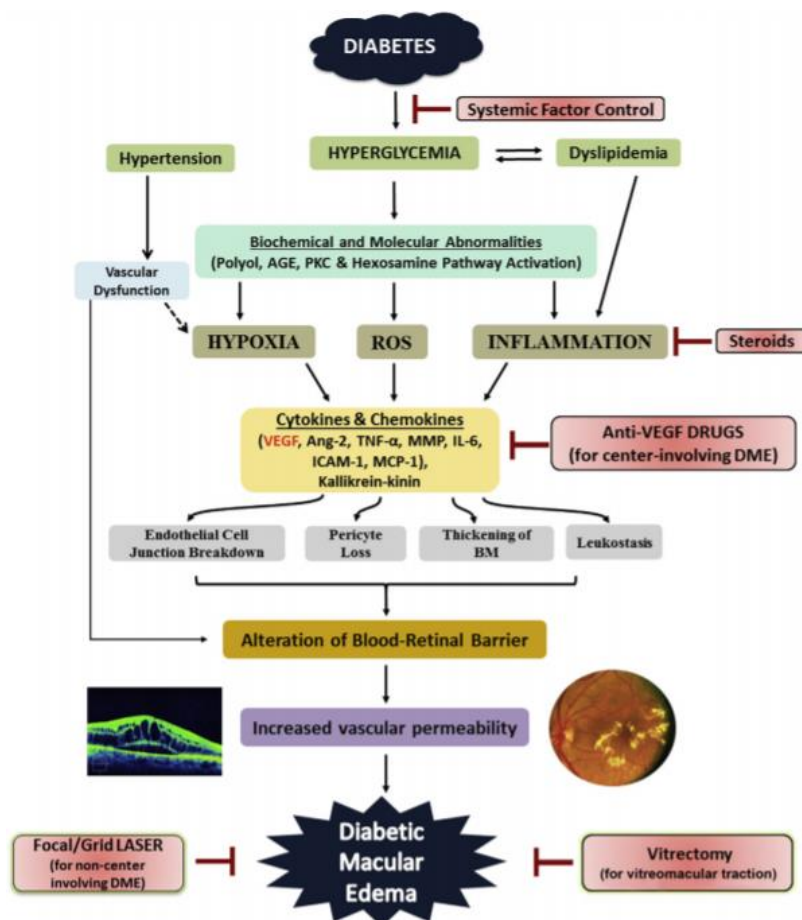


Figura 4. Desarrollo del Edema Macular Diabético

[15].

Los motivos resumidos anteriormente se han estudiado y caracterizado resultando en la definición completa de éstos.

Estrés oxidativo

En los pacientes diabéticos la hiperglicemia provoca la formación de radicales libres, peroxinitrito, superóxidos y aumento de los niveles de calcio intracelular llevando a la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS2) [32]. Este incremento de reactivos oxidativos en las células capilares de la retina tiene un efecto citotóxico provocando la muerte de los pericitos vasculares y de las células endoteliales conduciendo al desarrollo de EMD [34–36].

La NOS2 también puede ser activada por el Factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF1A), expresado durante la hipoxia retinal, generando óxido nítrico (NO) el cual es requerido para el efecto de VEGF en el EMD, VEGF a través de su receptor KDR promueve la producción de NO creándose así un ciclo de activación [32,36]. Asimismo, la hiperglicemia promueve la liberación de radicales libres aumentando así la producción de moléculas como el diacilglicerol (DAG), la proteína activadora quinasa C (PKC) y el miembro B1 de la familia 1 de la aldoceto reductasa (AKR1B1) [32,37], contribuyendo a la patogénesis de EMD mediante:

- Inducción/retención de células inflamatorias en la microcirculación ocular.
- Disminución de la expresión de proteínas de unión célula-célula.
- Incremento de la expresión de VEGF que conduce a alteraciones de BHR e incremento de la permeabilidad [37].

El incremento de radicales libres inducido por el estrés oxidativo provoca la activación de numerosas proteínas para contrarrestar el daño. Entre estas encontramos la eritropoyetina, la superóxido dismutasa, varias peroxiredoxinas y la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa [38,39].

Inflamación

Los mediadores y las cascadas inflamatorias tienen un papel importante en la patogenia de EMD, destacando en las etapas crónicas de la enfermedad correlacionándose con su gravedad [35]. La función principal de la respuesta inflamatoria es la de proteger contra el estrés de los tejidos, las infecciones y las lesiones, volviendo a la homeostasis una vez resueltos los factores de estrés. Cuando esta respuesta no se resuelve, se provoca el estrés tisular [40]. Existen numerosos activadores de la inflamación, entre ellos la hiperglucemia, el estrés oxidativo y / o isquemia provocados en las RD y EMD [32]. Se cree que la hiperglucemia es el principal iniciador de la respuesta inflamatoria en EMD, debido a que induce cambios epigenéticos y promueve la expresión persistente de genes relacionados con la inflamación en las células endoteliales, retinianas y renales, lo que da como resultado una desregulación de la inflamación y, en última instancia, una inflamación crónica [40]. Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno y los productos finales glicosilados avanzados también activan mediadores proinflamatorios [32].

Entre los efectores proinflamatorios activados encontramos: citosinas inflamatorias (Interleucina-6, interleucina-8, interleucina-1 beta, interleucina-1 alpha y el factor de necrosis tumoral), quimiocinas (quimiocina de motivo CC2, la quimiocina de motivo CC5, la quimiocina de motivo CXC10 y el factor 1 derivado de células estromales) moléculas de adhesión (molécula de adhesión intercelular 1 y la proteína de adhesión celular vascular 1), moléculas del complemento (componentes del complemento del 5-9) y prostaglandinas (prostaglandina G / H sintasa 1 y prostaglandina G / H sintasa 2) [35,41,42].

Estas vías proinflamatorias activan la migración de leucocitos produciendo leucostasis que puede conducir a la falta de perfusión capilar, hipoxia y muerte de las células endoteliales, la cual induce la degeneración del lecho capilar retiniano. La inducción de hipoxia crea un incremento de factores angiogénicos que junto a la regulación a la baja de las proteínas de unión del endotelio causa daño a la BHR, microangiopatía y EMD [35,41].

Alteración de la barrera sanguínea de la retina y la permeabilidad vascular

La progresión y fuga de líquido en el EMD se produce por cambios de permeabilidad y alteraciones de la barrera hemato-retiniana (BHR), a través de una combinación de anomalías vasculares y hemodinámicas.

La BHR está compuesta por una parte interna (los vasos retinianos) y una parte externa (la interfaz coriorretiniana) y se mantiene estructuralmente mediante uniones estrechas. La BHR mantiene la homeostasis de fluidos de la retina regulando el movimiento de fluidos y proteínas desde el espacio vascular hacia la retina. Durante el desarrollo de EMD, el daño dependiente del estrés oxidativo y la inflamación, las irregularidades en la perfusión y la presión provocan disfunción vascular que afecta su integridad y funcionamiento [32].

Se ha visto que VEGF es un importante factor de permeabilidad y sus receptores Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (FLT1) y Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (KDR) localizados en la vasculatura retiniana, son los principales mediadores del efecto de VEGF sobre la permeabilidad vascular y la angiogénesis patológica relacionada [41,43]. Estos efectos están mediados a través de la activación de las isoformas de PKC que son activados por VEGF, llevando a una regulación positiva de otras proteínas como la fosfolipasa A2 citosólica que afecta a la hemodinámica normal de la retina [32,43–45]. La activación de VEGF y posteriormente de las isoformas de PKC pueden ser inducidas por la angiotensina-2 y factores de crecimiento de hepatocitos, que llevan a una reducción en la expresión de proteínas de unión, un aumento en la migración e hipertrofia de pericitos y una mayor degradación de la BHR [32,43,45]. Otras proteínas importantes en la vía de VEGF que tienen un rol importante en la

ruptura de la BHR, en el aumento de la permeabilidad y que se han visto incrementadas en pacientes con EMD son el factor de crecimiento placentario (PGF) [32,46] y la galectina-1 (LGALS1) [47,48].

Durante la ruptura de la BHR se ha descrito una alteración de las uniones estrechas y la capa endotelial, una pérdida de pericitos y un engrosamiento de la membrana basal. Todo esto provoca la extravasación de líquido, electrolitos y moléculas más grandes hacia el espacio extracelular [43,49] desarrollándose así el EMD.

Ruptura de las uniones celulares y la capa endotelial

La BHR está formada por una monocapa compacta de células endoteliales que se unen entre sí mediante complejos de uniones estrechas y uniones adherentes producidas por las cadherinas endoteliales vasculares y ocludinas (OCLN), proteínas que son reducidas por la cascada que desencadena VEGF. Esto provoca una disminución en uniones estrechas y uniones adherentes que desemboca en la degradación de la monocapa endotelial [15,36].

Pérdida de pericitos

Durante el EMD hay una disminución en la adhesión intercelular y una degradación de la lámina basal entre los pericitos y las células endoteliales, debido a la regulación positiva de angiopoyetina-2 (ANGPT2) durante el EMD que desactivan las angiopoyetina-1 (TEK) y en consecuencia a la subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB) [36], provocando así una pérdida por desprendimiento o por apoptosis de pericitos y células endoteliales [15]. Esta pérdida hace que los pericitos no puedan realizar su función de regular el flujo sanguíneo capilar retiniano, además de inducirse la proliferación de células endoteliales debido a la ausencia de pericitos que conduce a la formación de microaneurismas [15].

Engrosamiento de la membrana basal

La membrana basal rodea las células endoteliales y los pericitos, proporcionando soporte estructural, actuando como barrera de filtración y regulando la proliferación y diferenciación celular. Durante el EMD se ha descrito un engrosamiento de esta membrana, lo que aumenta su porosidad a través de deposiciones de lamininas, colágeno y fibronectinas, provocando así una disminución de sus funciones [15,50].

Angiogénesis

Durante el desarrollo y progresión de la retinopatía diabética, cambios en la hipoxia, estrés oxidativo, inflamación, fugas, ruptura de vasos o permeabilidad pueden alterar el equilibrio entre factores angiostáticos y angiogénicos, dando lugar al aumento de factores proangiogénicos que puede inducir la remodelación de los vasos retinianos. Todo esto, conduce a un deterioro de la microvasculatura, microaneurismas, aumento de la permeabilidad vascular y edema [51,52]. Entre los efectores más importantes encontramos VEGF, PGF, VEGFB, LGALS1 y proteínas angiogénicas como ANGPT2, MET y FGF2 entre otras [49,52,53].

Las angiopoyetinas modulan la estabilidad de los vasos en el EMD a través de interacciones con los receptores tirosina quinasa (TEK y TIE1) que se ubican en las células endoteliales. Cuando estos receptores se activan o fosforilan, promueven la estabilidad vascular al aumentar la supervivencia, la adhesión y la estabilidad de las uniones de las células endoteliales. Durante el EMD, al originarse un estado hiperglucémico, o mediante una situación de hipoxia, la ANGPT2 se regula positivamente actuando como un regulador negativo de TEK y TIE1. Esta regulación negativa conduce a un aumento de la permeabilidad vascular y la capacidad de respuesta al VEGF y a las citocinas inflamatorias [35,36].

7.2. Caracterización molecular de los fármacos

Durante la revisión de la literatura se identificó que Ozurdex® y Iluvien® afectaban a la misma diana terapéutica, el receptor de glucocorticoides (GCR), pero presentaban diferencias farmacocinéticas. Por otro lado, ambos compartían efectos “downstream”. Por lo que durante la revisión no se pudo hacer una división entre Ozurdex® y Iluvien® y se consideró que los efectos “downstream” obtenidos son aplicables al tratamiento con corticosteroides en general (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla de efectos “downstream” de los corticosteroides.

Uniprot ID	Nombre de la proteína	Nombre del gen	Efecto	Referencias
P51843	Subfamilia 0 del receptor nuclear miembro 1 del grupo B	NR0B1	↑	[54]
P04141	Subunidad alfa del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos	CSF2	↓	[55]
P05362	Molécula de 24otive24r 24otive24r24al24r 1	ICAM1	↓	[17,42,56]
P01584	Interleucina-1 beta	IL1B	↓	[17,55,57]
P05231	Interleucina-6	IL6	↓	[17,42]
P10145	Interleucina-8	CXCL8	↓	[55,58,59]
P04054	Fosfolipasa A2	PLA2G1B	↓	[42,60]
P01375	Factor de necrosis tumoral	TNF	↓	[17,55,57]
P15692	Factor de crecimiento 24otive24r24al vascular A	VEGFA	↓	[17,42,61]
P22301	Interleucina-10	IL10	↑	[17,62]
P35354	Prostaglandina G / H sintasa 2	PTGS2	↓	[63,64]
P23219	Prostaglandina G / H sintasa 1	PTGS1	↓	[63,64]
P48061	Factor 1 derivado de células estromales	CXCL12	↓	[42]
P04083	Anexina A1	ANXA1	↑	[21,61,65]
P07355	Anexina A2	ANXA2	↑	[21,61,65]
P12429	Anexina A3	ANXA3	↑	[21,61,65]
P09525	Anexina A4	ANXA4	↑	[21,61,65]
P08758	Anexina A5	ANXA5	↑	[21,61,65]
P02751	Fibronectina	FN1	↑	[66]
P15502	Elastina	ELN	↑	[66]

Uniprot ID	Nombre de la proteína	Nombre del gen	Efecto	Referencias
Q04206	Factor de transcripción p65	RELA	↓	[17,67,68]
P39060	Cadena de colágeno alfa-1 (XVIII)	COL18A1	↓	[58]
P05412	Factor de transcripción AP-1	JUN	↓	[17]
Q07325	Quimiocina de 25otiv CXC 9	CXCL9	↓	[56]
P02778	Quimiocina de 25otiv CXC 10	CXCL10	↓	[17,56]
P18510	Proteína antagonista del receptor de interleucina-1	IL1RN	↓	[17]
P01579	Interferón gamma	IFNG	↓	[17]
P13501	Quimiocina de 25otiv CC 5	CCL5	↓	[17]
P03956	Colagenasa intersticial	MMP1	↓	[17]
P08253	Colagenasa de 72 kDa tipo IV	MMP2	↓	[17]
P08254	Stromelysin-1	MMP3	↓	[17]
P45452	Colagenasa 3	MMP13	↓	[17]
P01033	Inhibidor de metaloproteinasas 1	TIMP1	↓	[17]
P19320	Proteína de 25otiv25r 25otiv25r vascular 1	VCAM1	↓	[56]
P13500	Quimiocina de 25otiv CC 2	CCL2	↓	[56]
P08833	Proteína de 25otiv al factor de crecimiento similar a la insulina 1	IGFBP1	↓	[58,59]
P17936	Proteína 3 de 25otiv al factor de crecimiento similar a la insulina	IGFBP3	↓	[58,59]
P01236	Prolactina	PRL	↓	[58,59]
P14780	Metaloproteinasa-9 de matriz	MMP9	↓	[17,58]
P58294	Prokineticin-1	PROK1	↓	[58,59]
O15123	Angiopoyetina-2	ANGPT2	↓	[58,59]
O60542	Persefina	PSPN	↓	[58,59]
P35442	Trombospondina-2	THBS2	↓	[58,59]

Uniprot ID	Nombre de la proteína	Nombre del gen	Efecto	Referencias
P14210	Factor de crecimiento de hepatocitos	HGF	↓	[58,59]
Q9H2A7	Quimiocina 16 con 26otive CXC	CXCL16	↓	[58,59]
P10147	Motivo CC quimiocina 3	CCL3	↓	[58,59]
P25963	Inhibidor alfa de NF-kappa-B	NFKBIA	↑	[17]

(↓) Inhibición y (↑) activación

7.3. Relaciones moleculares entre los corticosteroides y los efectores del EMD

La Figura 5 representa el interactoma fármaco-patológico de los corticosteroides y los efectores proteicos del EMD. Se ha identificado que los corticosteroides actúan activando su diana terapéutica GCR, y esta acción deriva la modulación funcional de 47 proteínas como efectos “downstream”. De estas proteínas se ha visto que parte de ellas son efectoras de la patología (aparecen coloreadas en la Figura 5), mientras que otras no son proteínas efectoras, pero se relacionan con proteínas de varios motivos, como es el caso del factor de transcripción AP-1 (JUN) (color gris en la Figura 5), y otras que no son proteínas efectoras y no parecen tener una relación próxima a las proteínas efectoras de DME (no representadas).

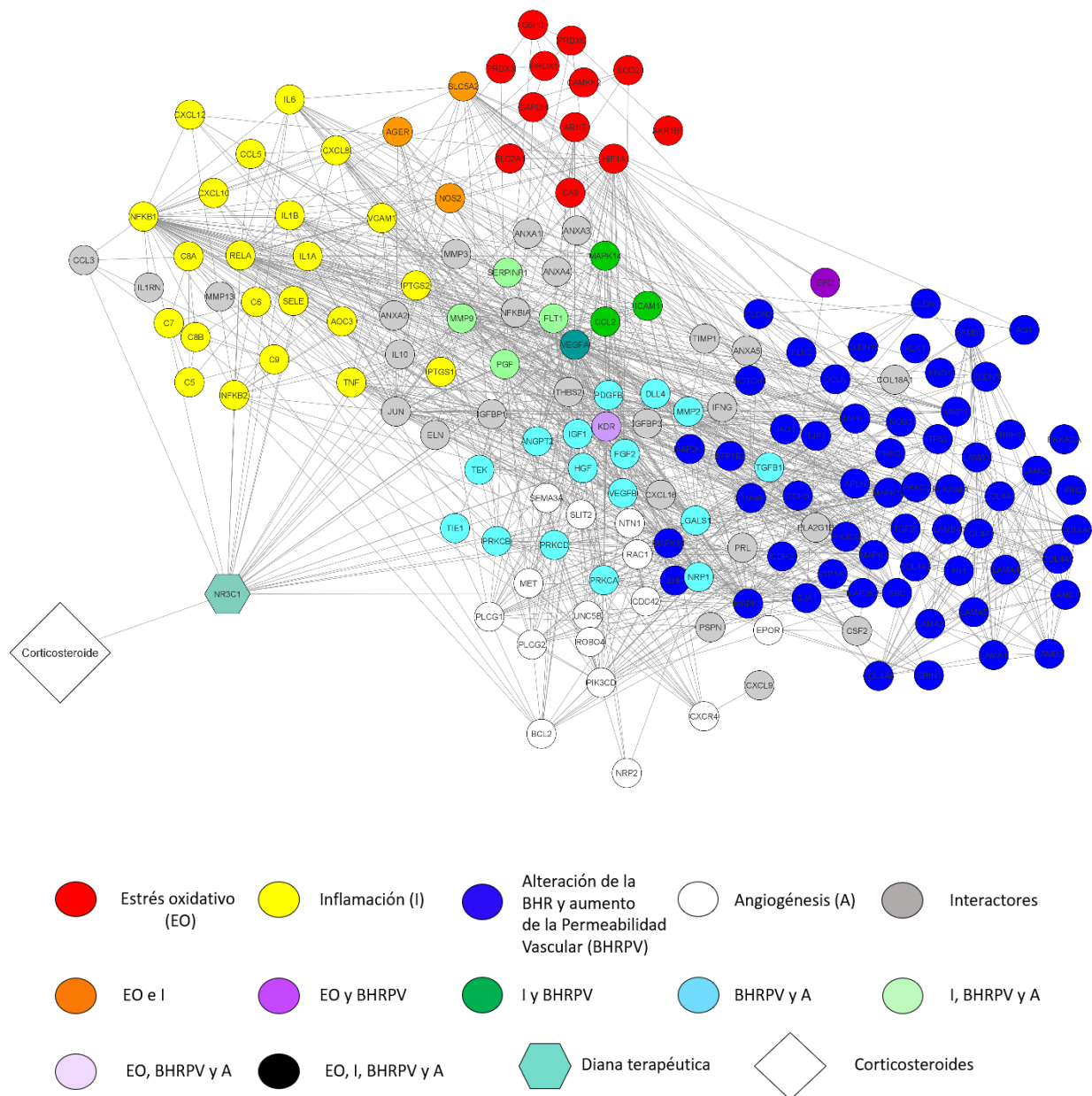


Figura 5. Interactoma del fármaco con los efectores de EMD. Las proteínas han sido identificadas en función del motivo o motivos a los que pertenecen. Aquellas que no pertenecen a la caracterización del fármaco aparecen coloreadas de gris.

7.4. Identificación del Mecanismo de Acción (MA)

Tras el análisis del modelo, se ha obtenido una representación gráfica de las vías moleculares y puntos importantes del efecto de los corticosteroides en el EMD (Figura 6).

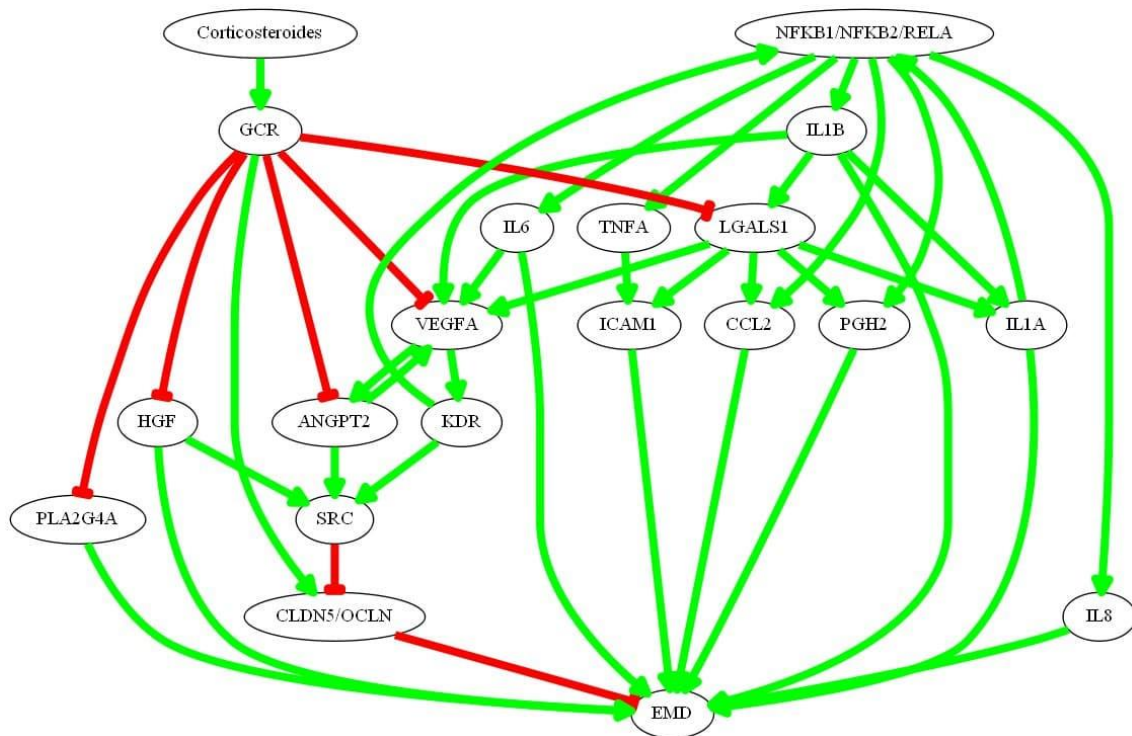


Figura 6. Representación gráfica del mecanismo de acción más relevante y probable de los corticosteroides en el tratamiento del EMD. Las líneas verdes indican activación y las líneas rojas inhibición.

El modelo generado contiene un total de 2955 proteínas y solo las proteínas más significativas matemáticamente aparecen en la representación gráfica del MA (Figura 6).

Los corticosteroides son unos potentes antiinflamatorios que se unen con gran especificidad a su diana terapéutica el Receptor Glucocorticoide (**GCR**) activándolo [17,69]. El GCR inhibe la síntesis de numerosos mediadores proinflamatorios [70], además de inhibir otras proteínas importantes en el desarrollo de EMD como VEGF y LGALS1. El principal objetivo de los corticosteroides es inhibir la inflamación, pero también se ha visto que modulan otros motivos como la angiogénesis y en especial la alteración de la BHR y la permeabilidad vascular.

- La angiopoyetina-2 (ANGPT2), es un factor de crecimiento que interactúa con receptores de tirosina quinasa (Tie2), localizado principalmente en células endoteliales. La ANGPT2 es positivamente regulada en estado hiperglucémico y actúa como un regulador negativo de Tie2 disminuyendo así la estabilidad vascular, la supervivencia celular, la adhesión, equilibrio de unión de las células endoteliales y en consecuencia comprometiendo la BHR [35]. Además, la activación de ANGPT2 aumenta la permeabilidad vascular regulando positivamente a VEGF y citocinas inflamatorias, promoviendo de esta manera la angiogénesis [35,36]. La inhibición de ANGPT2 por los

corticosteroides resulta en la inhibición de sus efectores downstream, los cuales están involucrados en el desarrollo de la patología.

- El factor de crecimiento vascular A (VEGF) es regulado positivamente por ANGPT2, IL-6, IL1B y LGALS1. VEGF es una proteína que tiene un gran protagonismo debido a que aparece en los 4 motivos descritos de la patología [71–74]. VEGFA activa NFKB1, NFKB2, RELA a través de KDR, modulando así la inflamación, la alteración de la BHR y la permeabilidad vascular y angiogénesis [75]. Por otro lado, al igual que la ANGPT2 y HGF, activa la SRC [71,76], la cual está implicada en la alteración de la BHR y la permeabilidad regulando negativamente las OCLN, suprimiendo así las uniones adherentes y promoviendo el desarrollo de la patología [77,78]. Se ha visto que VEGF tiene un efecto sinérgico con ANGPT2 por lo que se activan el uno al otro [79]. Debido al gran protagonismo de esta proteína en la patología, es importante su inhibición mediante los corticosteroides para tratar la enfermedad.
- Los factores nucleares-kB, NFKB1, NFKB2 y RELA, están implicados en la inflamación de la patología [80], son intermediarios de la vía de VEGF, activando proteínas proinflamatorias como CCL2, MMP-1, MMP-3, MMP-9, VCAM-1, TNF α , IL-6, PGH2 y IL-8 [75,81]. Además de estar activados por VEGFA, también son activados por IL1A [82]. Tras la inhibición de VEGF por los corticosteroides, estas son reguladas negativamente debido a que son sus intermediarios.
- La interleucina-8 (IL-8) al igual que la interleucina-6 (IL-6), son citocinas inflamatorias que se expresan cuando hay un incremento del estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno y productos finales glicosilados avanzados en la diabetes. Siendo activadas por NFKB1/NFKB2/RELA [83]. Estas proteínas junto a otras citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión inducen la migración de leucocitos, resultando en leucostasis. Esto causa la muerte de células endoteliales, la ruptura de la BHR y en definitiva el EMD. La IL1B, es una citoquina inflamatoria que actúa igual que la IL-8 e IL-6, induciendo la leucostasis y en consecuencia desarrollando EMD [35]. IL1B es activada por NFKB1/NFKB2/RELA e induce la activación de la Galectina-1 (LGALS1) a través del IL1R1 y de la activación de las vías ERK1/2 y PI3K [48]. El factor de necrosis tumoral (TNF α) causa leucostasis retinal, quimioatracción de monocitos y regulación positiva de moléculas adhesivas como la ICAM-1 [84], por lo cual una sobreexpresión de este por la NFKB1/NFKB2/RELA induce la ruptura de BHR [15]. Estos mediadores inflamatorios son

regulados negativamente gracias a la acción de los corticosteroides inhibiendo la acción de sus activadores.

- La galectina-1 (LGALS1), es un factor angiogénico inducido por IL1B a través de la señalización de ERK1/2 y PI3K [48]. LGALS1 promueve la proliferación y migración de células endoteliales por la unión directa a NRP-1, sirve como receptor para mediar la permeabilidad vascular [85] y activa proteínas como las metaloproteinasas a través de la IL1A [86]. Esta tiene varias vías, como la regulación positiva de CCL2, de ICAM-1, IL1A y finalmente de PGH2 por lo que podemos observar que está involucrada en la ruptura de la BHR y permeabilidad al igual que en la angiogénesis [86,87]. Gracias a la acción de los corticosteroides se inhibe esta proteína mediante el GCR, inhibiendo así un punto importante dentro de la patología.
- La quimiocina de motivo CC2 (CCL2), es regulada positivamente por LGALS1 NFKB y está sobreexpresada en pacientes con EMD. CCL2 está implicada en la permeabilidad vascular retiniana y en la infiltración de monocitos. Los monocitos infiltrados secretan citoquinas y factores de crecimiento como VEGF, ANGPT2, TNF α , MMP-2 y MMP-9 alterando así la BHR. Al igual que IL-8 y IL-6, CCL2 actúa junto con otras citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión desarrollando EMD [15,48]. La inhibición de LGALS1 y NFKB por los corticosteroides resulta en la regulación a la baja de la CCL2.
- La molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), es un marcador de inflamación producido y expresado en la superficie endotelial. Esta produce obstrucción capilar mediante la adhesión de leucocitos y las células endoteliales. Por lo que el control negativo de esta proteína ayudaría a reducir la inflamación y la permeabilidad vascular que se desarrolla en el EMD [35,43]. Se ha visto que ICAM-1 está regulada positivamente tanto por TNF α [88] como por LGALS1, que la activa a través de VEGFR2. La inhibición de esta proteína gracias a la regulación negativa de las vías disminuye la inflamación a través de los corticosteroides, mantiene la BHR y mejora la angiogénesis ocular, evitando así el desarrollo del EMD [87].
- La interleucina 1 alpha (IL1A) es un mediador de la inflamación que se sobreexpresa a través de LGALS1. La regulación positiva de IL1A induce la expresión de metaloproteinasas, en especial de la MMP9 la cual interfiere en la inflamación, en la

ruptura de BHR y angiogénesis conduciendo así al desarrollo del EMD [41,86,89]. Finalmente, también se ha visto que la IL1A regula positivamente la cascada de NFKB1/NFKB2/RELA a través del IL1R, produciendo así una mayor expresión de moléculas inflamatorias y regulando positivamente el EMD [90]. Por lo que su inhibición con los corticosteroides regula negativamente estas vías.

- PGH2, también llamado COX-2, es la prostaglandina G/H sintasa 2, la cual está involucrada en el proceso de inflamación dentro del EMD [91]. La regulación positiva es a través de la LGALS1 y conduce al desarrollo del EMD [92]. Esta al igual que los reguladores inflamatorios mencionados anteriormente son regulados negativamente mediante los corticosteroides, siendo la inflamación el objetivo principal de estos fármacos.
- Otra vía que toma GCR es la de inhibir la fosfolipasa citosólica A2 (PLA2G4A), una proteína que es activada en el EMD a través de la activación de las isoformas de la proteína quinasa (PKC) [44]. Los corticosteroides mediante la inhibición de PLA2G4A bloquean la vía del ácido araquidónico, regulando a la baja los tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas. Mediante este bloqueo con los corticosteroides se provoca un aumento de las uniones estrechas en el endotelio capilar, una mejor oxigenación en la retina y en consecuencia una mejora en la BHR evitando así el desarrollo de la patología [44,70].
- La claudina-5 (CLDN5) y la ocludina (OCLN) son proteínas transmembrana que participan en las uniones estrechas y adherentes. Son activada por GRC tras utilizar los corticosteroides [15,93]. Estas se copolimerizan con otras claudinas y ocludinas activándose entre ellas [36,94]. Durante el desarrollo de la patología estas son reguladas negativamente por la SRC, comprometiendo así las uniones estrechas y adherentes y produciendo una ruptura en la BHR [77]. Los corticosteroides han mostrado que pueden regular esta vía positivamente a través de la regulación negativa de HGF y ANGPT2 [71,76].
- El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) juega un importante papel en la permeabilidad y angiogénesis. Este es expresado bajo condiciones de hipoxia y junto con sus receptores es expresado en las células endoteliales de la retina. Su efecto a

través de la vía de las PI3K y las MAPK reduce la expresión de claudinas y ocludinas promoviendo así la ruptura de BHR, la angiogénesis y en definitiva el EMD. Bloqueando esta vía a través de los corticosteroides se mejora las uniones estrechas mediante la regulación positiva de claudinas y ocludinas [32].

- La Proto-oncogén tirosina-proteína quinasa SRC (SRC) se ha visto que está regulada positivamente tanto por la VEGF (a través de KDR) como por ANGPT2 y HGF. [71,76]. Esta altera negativamente las uniones estrechas y adherentes a través de la regulación negativa de la proteína de unión estrecha ZO-1 (ZO-1) y CLDN5/OCLN [77].

8. DISCUSIÓN

El EMD es una patología que afecta a un gran número de pacientes, provocando pérdida de visión y ceguera. La gran mayoría de los estudios se centran en los anti-VEGF, los cuales se utilizan como fármacos de primera línea pero que no siempre son efectivos [2–4]. Es por eso por lo que es necesario ampliar los conocimientos de los fármacos de segunda línea (Ozurdex® e Iluvien®) para comprender su funcionamiento, fomentando así su utilización. Desde su desarrollo y comercialización, se han realizado numerosos estudios evaluando sus efectos fisiopatológicos, así como la farmacocinética y farmacodinámica, en especial de Ozurdex® [18,19]. Sin embargo, pocos estudios han intentado explicar sus vías de señalización.

La biología de sistemas cada día es más utilizada y nos permite estudiar los mecanismos de acción de los fármacos en los contextos de una patología de una forma sencilla, barata y rápida [28,29]. Por esto, el presente estudio fue diseñado utilizando una estrategia basada en biología de sistemas, con el objetivo de demostrar su gran potencial y eficacia. Se utilizó una combinación de datos clínicos y bibliográficos para la identificación de las vías de señalización principales por las que los corticosteroides modulan el EMD. Hasta donde conocemos, este es el primer trabajo que estudia la acción de los corticosteroides en el EMD mediante la utilización de la biología de sistemas. Estudios previos de utilización de corticosteroides en pacientes con EMD, además de la acción de los corticosteroides en otros contextos, han contribuido al desarrollo del trabajo.

En el presente estudio, se ha descrito al detalle tanto el EMD como los fármacos Ozurdex® e Iluvien®, los cuales han sido tratados como un conjunto (corticosteroides). Gracias a la información recopilada se ha obtenido una representación del MA por el cual los corticosteroides modulan el EMD (Figura 6). La figura muestra los mecanismos moleculares con mayor probabilidad de modular el EMD. Es necesario decir que no todos los genes o proteínas que se calcula que están implicados en el MA están representados, solo los más matemáticamente relevantes, al igual que también es destacable que el modelo integra restricciones definidas manualmente y usa información de bases de datos oficiales, pero aun así es imposible asegurar la certeza de todos y cada uno de los enlaces que se originan.

Como es evidente, en el estudio hemos determinado que los corticosteroides inhiben la inflamación al reducir los niveles de las proteínas proinflamatorias. La inflamación se ha descrito como un importante mecanismo en el desarrollo y progresión de EMD [35]. La diana terapéutica de los corticosteroides (GCR), regula negativamente las proteínas VEGF, NFKB1, NFKB2, RELA, IL-8, IL-6, IL1B, IL1A, TNF α , CCL2, ICAM1, y PGH2, las cuales hemos descrito como causantes de la inflamación, datos que fueron reportados anteriormente por otros autores [2,95]. Esta

regulación negativa de las vías proinflamatorias evita la activación de la migración de leucocitos, la leucostasis, la hipoxia y muerte celular endotelial, la degradación del lecho capilar retiniano y la regulación a la baja de las proteínas de unión estrechas y adherentes, implicadas en la alteración de BHR y permeabilidad vascular y en la angiogénesis [32,35,41,96]. Estos resultados concuerdan con estudios previos, en los que se ha descrito la implicación de los corticosteroides en la inflamación [70,95].

Las proteínas VEGF y LGALS1, las cuales se han clasificado como importantes en el desarrollo del EMD, son reguladas a la baja por los corticosteroides [2,97]. VEGF modula los 4 motivos descritos para el EMD, datos que concuerdan en artículos de la caracterización del EMD [35,49,59]. Por otro lado, LGALS1, activado por ILB1, modula la alteración de la BHR y aumento de la permeabilidad y la angiogénesis [85,97]. Un estudio ha llegado a documentar la inhibición de LGALS1 por GCR a través de la ILB1 [97], pero sin llegar a profundizar en las consecuencias que conlleva la inhibición de esta proteína, la cual, como hemos descrito, está implicada en la regulación positiva de CCL2, ICAM-1, IL1A, VEGF y PGH2. La inhibición de estas proteínas es por tanto relevante para el tratamiento de EMD.

Durante el EMD las proteínas proinflamatorias y en especial las proteínas VEGF y LGALS1 se encuentran sobreexpresadas produciendo una alteración en la BHR y la permeabilidad vascular [32,43,48]. En el presente estudio se ha descrito que las proteínas VEGF y LGALS1 regulan positivamente proteínas como CCL2, PLA2G4A y ICAM-1, las cuales son responsables de la alteración de la BHR y la permeabilidad vascular. GCR las regula negativamente, mejorando así la BHR [56,60]. Dos autores han descrito este motivo de permeabilidad vascular, mostrando que es regulado por GCR mediante la inhibición de las proteínas VEGF, ICAM-1 y CCL2 [56,98]. Nosotros hemos ido un paso más allá, describiendo con mayor detalle la regulación de este motivo, y hemos determinado que es regulado mediante 2 vías. En la primera GCR inhibe VEGF, ANGPT2, HGF y en consecuencia SRC, evitando que SRC inhiba las CLDN5/OCLN, manteniendo así la BHR. La segunda vía, es, mediante la regulación positiva de las proteínas CLDN5/OCLN a través del GCR, mejorando la integridad de la BHR.

La angiogénesis en el EMD está principalmente regulada por VEGF, PGF, VEGFB y LGALS1. Tanto VEGF como LGALS1 se han visto reguladas en el MA generado, que junto a la regulación de otras proteínas como ANGPT2 y HGF, se observa una regulación negativa de la angiogénesis por parte de los corticosteroides [99,100]. Además, se ha determinado que las vías proinflamatorias están involucradas en la regulación positiva de la angiogénesis, cosa que también han determinado en un estudio previo utilizando ratones [100].

Finalmente, el MA ha mostrado una ligera regulación del estrés oxidativo mediante la regulación negativa de VEGF y su receptor KDR, además de la MMP9 a través de la IL1A. Como se ha descrito en los motivos, VEGF produce NO a través de KDR, contribuyendo así al estrés oxidativo. Estos datos son respaldados por un estudio en el que se documentó la participación de VEGF en el EMD [32].

Una de las principales limitaciones de este estudio, es que no se ha modelado la farmacocinética y la estrategia basada en la tecnología TPMS que hemos seguido no utiliza datos sobre la dosis del fármaco o la cantidad de expresión de las proteínas. La cuantificación de la disponibilidad de fármacos en el tejidos diana sería interesante de simular, debido a que se trata de implantes intravítreos, una fórmula que debería de ser beneficiosa respecto a otras formas de administración.

Por otro lado, se pretendía caracterizar por separado Ozurdex® y Iluvien®, pero debido a que durante la revisión se identificó que ambos afectaban a la misma diana terapéutica y compartían efectos “downstream”, se consideraron ambos fármacos como corticosteroides en general.

9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Debido a que la caracterización del EMD ya está realizada, sería necesario continuar realizando estudios *in silico* para esta patología. Se podrían investigar los efectos secundarios que van acompañados con la utilización de los corticosteroides, para poder buscar soluciones y controlarlos, demostrando la eficacia de los estudios *in silico* en el ámbito de los efectos secundarios. Por otro lado, se podría realizar una comparación con los tratamientos de anti-VEGF para evaluar sus diferencias y obtener un mayor conocimiento de los tratamientos de esta patología. Finalmente, se podría intentar investigar las vías/razones por las cuales algunos de los pacientes no responden a los tratamientos del EMD.

10. CONCLUSIÓN

Mediante la realización de las caracterizaciones y posterior creación del modelo hemos podido estudiar la acción de los corticosteroides en el EMD, obteniendo predicciones detalladas de las vías de señalización moduladas por la terapia de estudio.

En el presente estudio hemos demostrado que los corticosteroides además de inhibir la inflamación también modulan la alteración de la BHR y permeabilidad vascular, la angiogénesis y ligeramente el estrés oxidativo.

Hemos demostrado la alta eficacia que presentan los modelos *in silico* al predecir el MA del tratamiento del EMD con corticosteroides. Gracias a nuestro análisis se ha generado con gran detalle una representación de las vías relevantes de los corticosteroides en el EMD.

11. AUTOEVALUACIÓN

Durante mis 4 años de formación como biotecnólogo he podido explorar todas las ramas de la biotecnología, y tras esto, he comprendido que lo que más me llama la atención y más me llena es la rama de la bioinformática. Cuando tan solo estaba buscando las prácticas, contacté con mi profesor Gerard Pujadas mostrándole mi interés en realizar prácticas en bioinformática, a lo cual el me ayudó buscándome las prácticas en Anaxomics.

Durante mis primeros días en Anaxomics estuve algo sorprendido, debido a la gran cantidad de trabajo que tenía y el gran número de protocolos nuevos que debía de tener en cuenta. Conforme avanzaban los días aprendía cosas nuevas y me iba integrando cada vez más y más en el mundo laboral, haciendo sentirme bien conmigo mismo debido al trabajo que realizaba día a día.

Debido a la situación actual, mi estancia en la empresa ha sido algo diferente. Nos hemos tenido que adaptar ambos al formato de “teletrabajo”. Aunque no he tenido la oportunidad de realizar las prácticas presencialmente, considero que he podido aprovechar al máximo la oportunidad y he podido adquirir gran cantidad de conocimientos.

Gracias a esto, mis habilidades en biología de sistemas han aumentado considerablemente debido al conocimiento que he adquirido durante mi estancia. He aprendido a recopilar gran cantidad de información, analizarla de forma rápida y eficaz, desarrollar imágenes, gestionar los proyectos y sobretodo he aprendido a adaptarme a las situaciones que se van originando, desarrollando mi capacidad de adaptación y resolución de problemas.

En conclusión, esta experiencia me ha hecho crecer como persona, pero también como investigador, ayudándome a escoger que camino quiero tomar en mi futuro.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Jorba G, Aguirre-Plans J, Junet V, Segú-Vergés C, Ruiz JL, Pujol A, et al. In-silico simulated prototype-patients using TPMS technology to study a potential adverse effect of sacubitril and valsartan. *PLoS One*. 2020 Feb 1;15(2).
2. Gurreri A, Pazzaglia A. Diabetic Macular Edema: State of Art and Intraocular Pharmacological Approaches. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer; 2021. p. 375–89.
3. Bandello F, Battaglia Parodi M, Lanzetta P, Loewenstein A, Massin P, Menchini F, et al. Diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol*. 2017;58:102–38.
4. Cohen SR, Gardner TW. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol*. 2015;55:137–46.
5. Diabetic macular edema - Mayo Clinic [Internet]. [cited 2021 May 29]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/diabetic-retinopathy/multimedia/diabetic-macular-edema/img-20124558>
6. Wong TY, Sun J, Kawasaki R, Ruamviboonsuk P, Gupta N, Lansingh VC, et al. Guidelines on Diabetic Eye Care: The International Council of Ophthalmology Recommendations for Screening, Follow-up, Referral, and Treatment Based on Resource Settings. Vol. 125, *Ophthalmology*. Elsevier Inc.; 2018. p. 1608–22.
7. Ophthalmology IC of. *ICO Guidelines for Diabetic Eye Care*. 2017.
8. Chung YR, Kim YH, Ha SJ, Byeon HE, Cho CH, Kim JH, et al. Role of Inflammation in Classification of Diabetic Macular Edema by Optical Coherence Tomography. Vol. 2019, *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Limited; 2019.
9. Gundogan FC, Yolcu U, Akay F, Ilhan A, Ozge G, Uzun S. Diabetic macular edema. Vol. 32, *Pakistan Journal of Medical Sciences*. Professional Medical Publications; 2016. p. 505–10.
10. Unnikrishnan R, Pradeepa R, Joshi SR, Mohan V. Type 2 diabetes: Demystifying the global epidemic. Vol. 66, *Diabetes*. American Diabetes Association Inc.; 2017. p. 1432–42.
11. Jansen ME, Krambeer CJ, Kermany DS, Waters JN, Tie W, Bahadorani S, et al. Appointment compliance in patients with diabetic macular edema and exudative macular degeneration. In: *Ophthalmic Surgery Lasers and Imaging Retina*. Slack Incorporated; 2018. p. 186–90.
12. Li JQ, Welchowski T, Schmid M, Letow J, Wolpers C, Pascual-Camps I, et al. Prevalence, incidence and future projection of diabetic eye disease in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2020 Jan 1;35(1):11–23.
13. Romero-Aroca P, De La Riva-Fernandez S, Valls-Mateu A, Sagarra-Alamo R, Moreno-Ribas A, Soler N. Changes observed in diabetic retinopathy: Eight-year follow-up of a Spanish population. *Br J Ophthalmol*. 2016 Oct 1;100(10):1366–71.
14. Diep TM, Tsui I. Risk factors associated with diabetic macular edema. Vol. 100, *Diabetes Research and Clinical Practice*. *Diabetes Res Clin Pract*; 2013. p. 298–305.
15. Das A, McGuire PG, Rangasamy S. Diabetic Macular Edema: Pathophysiology and Novel Therapeutic Targets. Vol. 122, *Ophthalmology*. Elsevier Inc.; 2015. p. 1375–94.

16. Abreu-Gonzalez R, Gallego-Pinazo R, Abrales M, Pinilla I, Lopez-Galvez MI. Management of diabetic macular edema patients in clinical practice in Spain. *Eur J Ophthalmol*. 2019 Nov 1;29(6):664–72.
17. Rodríguez Villanueva J, Rodríguez Villanueva L, Guzmán Navarro M. Pharmaceutical technology can turn a traditional drug, dexamethasone into a first-line ocular medicine. A global perspective and future trends. Vol. 516, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V.; 2017. p. 342–51.
18. Chawan-Saad J, Wu M, Wu A, Wu L. Corticosteroids for diabetic macular edema. Vol. 9, *Taiwan Journal of Ophthalmology*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2019. p. 233–42.
19. Kim M, Cho YJ, Lee CH, Lee SC. Effect of intravitreal dexamethasone implant on retinal and choroidal thickness in refractory diabetic macular oedema after multiple anti-VEGF injections. *Eye*. 2016 May 1;30(5):718–25.
20. Whitcup SM, Cidlowski JA, Csaky KG, Ambati J. Pharmacology of corticosteroids for diabetic macular edema. Vol. 59, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. Association for Research in Vision and Ophthalmology Inc.; 2018. p. 1–12.
21. Fda, Cder. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION.
22. Sciences A. Alimera Sciences' ILUVIEN® Receives 17th European Marketing Authorization; Completing Second Wave Of Country Approvals [Internet]. [cited 2021 May 29]. Available from: <https://www.prnewswire.com/news-releases/alimera-sciences-iluvien-receives-17th-european-marketing-authorization-completing-second-wave-of-country-approvals-300065146.html>
23. Schmidt-Erfurth U, Garcia-Arumi J, Bandello F, Berg K, Chakravarthy U, Gerendas BS, et al. Guidelines for the management of diabetic macular edema by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). Vol. 237, *Ophthalmologica*. S. Karger AG; 2017. p. 185–222.
24. Cervera E, De Andrés-Nogales F, Armadá F, Arias L, Oyagüez I, Martínez C. Budget impact analysis of dexamethasone intravitreal implant for the treatment of diabetic macular oedema. *Farm Hosp*. 2018 Nov 1;42(6):244–50.
25. Hussain RM, Ciulla TA. Treatment strategies for refractory diabetic macular edema: Switching anti-VEGF treatments, adopting corticosteroid-based treatments, and combination therapy. Vol. 16, *Expert Opinion on Biological Therapy*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 365–74.
26. Nielsen J. Systems biology of metabolism. Vol. 86, *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews Inc.; 2017. p. 245–75.
27. Romeo-Guitart D, Forés J, Herrando-Grabulosa M, Valls R, Leiva-Rodríguez T, Galea E, et al. Neuroprotective Drug for Nerve Trauma Revealed Using Artificial Intelligence. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
28. Carvalho C, Varela SAM, Marques TA, Knight A, Vicente L. Are in vitro and in silico approaches used appropriately for animal-based major depressive disorder research? *PLoS One*. 2020 Jun 1;15(6 June).
29. Valerio LG. Application of advanced in silico methods for predictive modeling and information integration. Vol. 8, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. Expert Opin Drug Metab Toxicol; 2012. p. 395–8.

30. Artigas L, Coma M, Matos-Filipe P, Aguirre-Plans J, Farrés J, Valls R, et al. In-silico drug repurposing study predicts the combination of pirfenidone and melatonin as a promising candidate therapy to reduce SARS-CoV-2 infection progression and respiratory distress caused by cytokine storm. *PLoS One*. 2020 Oct 1;15(10 October).
31. Gómez-Serrano M, Camafeita E, García-Santos E, López JA, Rubio MA, Sánchez-Pernaute A, et al. Proteome-wide alterations on adipose tissue from obese patients as age-, diabetes- and gender-specific hallmarks. *Sci Rep*. 2016 May 10;6.
32. Ehrlich R, Harris A, Ciulla TA, Kheradiya N, Winston DM, Wirostko B. Diabetic macular oedema: Physical, physiological and molecular factors contribute to this pathological process. Vol. 88, *Acta Ophthalmologica*. Acta Ophthalmol; 2010. p. 279–91.
33. Haritoglou C, Maier M, Augustin A. Pathophysiology of diabetic macular edema—a background for current treatment modalities. Vol. 13, *Expert Review of Ophthalmology*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 273–81.
34. Al-Kharashi AS. Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy. Vol. 32, *Saudi Journal of Ophthalmology*. Elsevier B.V.; 2018. p. 318–23.
35. Miller K, Fortun JA. Diabetic macular edema: Current understanding, pharmacologic treatment options, and developing therapies. Vol. 7, *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology; 2018. p. 28–35.
36. Klaassen I, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. Vol. 34, *Progress in Retinal and Eye Research*. Prog Retin Eye Res; 2013. p. 19–48.
37. Zhang X, Zeng H, Bao S, Wang N, Gillies MC. Diabetic macular edema: New concepts in patho-physiology and treatment. Vol. 4, *Cell and Bioscience*. BioMed Central Ltd; 2014.
38. Gurung RL, FitzGerald LM, McComish BJ, Verma N, Burdon KP. Identifying Genetic Risk Factors for Diabetic Macular Edema and the Response to Treatment. Vol. 2020, *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Limited; 2020.
39. Huang H, Saddala MS, Lennikov A, Mukwaya A, Fan L. RNA-Seq reveals placental growth factor regulates the human retinal endothelial cell barrier integrity by transforming growth factor (TGF- β) signaling. *Mol Cell Biochem*. 2020 Dec 1;475(1–2):93–106.
40. Boyer DS. DME: FOCUS ON MULTIPLE TARGETS Inflammation plays a prominent role in the etiology of diabetes and its complications.
41. Amoaku WM, Ghanchi F, Bailey C, Banerjee SS, Banerjee SS, Downey L, et al. Diabetic retinopathy and diabetic macular oedema pathways and management: UK Consensus Working Group. Vol. 34, *Eye (Basingstoke)*. Springer Nature; 2020.
42. Amoaku WMK, Saker S, Stewart EA. A review of therapies for diabetic macular oedema and rationale for combination therapy. *Eye*. 2015 Sep 11;29(9):1115–30.
43. Funatsu H, Yamashita H, Sakata K, Noma H, Mimura T, Suzuki M, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2005 May;112(5):806–16.
44. Fogli S, Mogavero S, Egan CG, Del Re M, Danesi R. Pathophysiology and pharmacological targets of VEGF in diabetic macular edema. Vol. 103, *Pharmacological*

- Research. Academic Press; 2016. p. 149–57.
45. Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. Diabetic Macular Edema: Pathogenesis and Treatment. Vol. 54, Survey of Ophthalmology. Surv Ophthalmol; 2009. p. 1–32.
 46. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012 Jun 3;15(2):171–85.
 47. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Aflibercept Traps Galectin-1, an Angiogenic Factor Associated with Diabetic Retinopathy. *Sci Rep*. 2015 Dec 9;5.
 48. Kanda A, Dong Y, Noda K, Saito W, Ishida S. Advanced glycation endproducts link inflammatory cues to upregulation of galectin-1 in diabetic retinopathy. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
 49. Uemura A, Fruttiger M, D'Amore PA, De Falco S, Jousseaume AM, Sennlaub F, et al. VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2021. p. 100954.
 50. Miller CG, Budoff G, Prenner JL, Schwarzbauer JE. Minireview: Fibronectin in retinal disease. *Exp Biol Med*. 2017 Jan 1;242(1):1–7.
 51. Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Pareja-Rios A, Lopez-Galvez M, Navarro-Gil R, Verges R. Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory. Vol. 2016, Journal of Diabetes Research. Hindawi Limited; 2016.
 52. Nguyen QD, De Falco S, Behar-Cohen F, Lam WC, Li X, Reichhart N, et al. Placental growth factor and its potential role in diabetic retinopathy and other ocular neovascular diseases. Vol. 96, *Acta Ophthalmologica*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. e1–9.
 53. Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: Old concepts and new questions. Vol. 16, *Eye*. Royal College of Ophthalmologists; 2002. p. 242–60.
 54. DrugBank. Dexamethasone acetate: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 May 29]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB14649>
 55. Hadayer A, Schaal S. Delivery of steroids into the eye for the treatment of macular edema. Vol. 13, *Expert Opinion on Drug Delivery*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 1083–91.
 56. Podkowinski D, Orłowski-Wimmer E, Zlabinger G, Pollreisz A, Mursch-Edlmayr AS, Mariacher S, et al. Aqueous humour cytokine changes during a loading phase of intravitreal ranibizumab or dexamethasone implant in diabetic macular oedema. *Acta Ophthalmol*. 2020 Jun 1;98(4):e407–15.
 57. Chuang TY, Cheng AJ, Chen IT, Lan TY, Huang IH, Shiao CW, et al. Suppression of LPS-induced inflammatory responses by the hydroxyl groups of dexamethasone. *Oncotarget*. 2017;8(30):49735–48.
 58. Figueras-Roca M, Sala-Puigdollers A, Alforja S, Torras J, Peraza-Nieves J, Zarranz-Ventura J, et al. Aqueous Humour Cytokine Changes with Intravitreal Dexamethasone Implant Injection for Diabetic Macular Edema. *Ocul Immunol Inflamm*. 2019 Nov 17;27(8):1203–10.
 59. Campochiaro PA, Hafiz G, Mir TA, Scott AW, Zimmer-Galler I, Shah SM, et al. Pro-

- permeability Factors in Diabetic Macular Edema; The Diabetic Macular Edema Treated with Ozurdex Trial. *Am J Ophthalmol*. 2016 Aug 1;168:13–23.
60. Figueras-Roca M, Sala-Puigdollers A, Zarranz-Ventura J, Alba-Linero C, Alforja S, Esquinas C, et al. Anatomic response to intravitreal dexamethasone implant and baseline aqueous humor cytokine levels in diabetic macular edema. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2019 Apr 1;60(5):1336–43.
 61. Syed YY. Fluocinolone Acetonide Intravitreal Implant 0.19 mg (ILUVIEN®): A Review in Diabetic Macular Edema. *Drugs*. 2017 Apr 1;77(5):575–83.
 62. Ceravolo I, Oliverio GW, Alibrandi A, Bhatti A, Trombetta L, Rejdak R, et al. The application of structural retinal biomarkers to evaluate the effect of intravitreal ranibizumab and dexamethasone intravitreal implant on treatment of diabetic macular edema. *Diagnostics*. 2020 Jun 1;10(6).
 63. CHMP. ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS.
 64. Yao C, Narumiya S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. Vol. 176, *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 337–54.
 65. Dugel PU, Bandello F, Loewenstein A. Dexamethasone intravitreal implant in the treatment of diabetic macular edema. Vol. 9, *Clinical Ophthalmology*. Dove Medical Press Ltd; 2015. p. 1321–35.
 66. Pranata R, Vania A, Vania R, Victor AA. Intravitreal ranibizumab versus dexamethasone implant in macular edema due to branch retinal vein occlusion: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Ophthalmol*. 2020;
 67. Aghai ZH, Kumar S, Farhath S, Kumar MA, Saslow J, Nakhla T, et al. Dexamethasone suppresses expression of nuclear factor-kappaB in the cells of tracheobronchial lavage fluid in premature neonates with respiratory distress. *Pediatr Res*. 2006 Jun;59(6):811–5.
 68. Danis RP, Sadda S, Li XY, Cui H, Hashad Y, Whitcup SM. Anatomical effects of dexamethasone intravitreal implant in diabetic macular oedema: A pooled analysis of 3-year phase III trials. *Br J Ophthalmol*. 2016 Jun 1;100(6):796–801.
 69. Zhang YY, Li X, Qian SW, Guo L, Huang HY, He Q, et al. Down-regulation of type I Runx2 mediated by dexamethasone is required for 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol*. 2012 May;26(5):798–808.
 70. Zur D, Iglicki M, Loewenstein A. The Role of Steroids in the Management of Diabetic Macular Edema. Vol. 62, *Ophthalmic Research*. S. Karger AG; 2019. p. 231–6.
 71. Whitehead M, Osborne A, Widdowson PS, Yu-Wai-Man P, Martin KR. Angiopoietins in Diabetic Retinopathy: Current Understanding and Therapeutic Potential. Vol. 2019, *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Limited; 2019.
 72. Abu El-Asrar AM, Ahmad A, Allegaert E, Siddiquei MM, Alam K, Gikandi PW, et al. Galectin-1 studies in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 2020 Feb 1;98(1):e1–12.
 73. Wooff Y, Man SM, Aggio-Bruce R, Natoli R, Fernando N. IL-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
 74. Rojas M, Zhang W, Lee DL, Romero MJ, Nguyen DT, Al-Shabrawey M, et al. Role of IL-6

- in angiotensin II-induced retinal vascular inflammation. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Mar;51(3):1709–18.
75. De-xian Yu, Shi-jun Pi WZ. [Clinical manifestation of Kaposi sarcoma in otorhinolaryngology head and neck surgery] - PubMed [Internet]. [cited 2021 May 29]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23755792/>
 76. Pongchairerk U, Guan JL, Leardkamolkarn V. Focal adhesion kinase and Src phosphorylations in HGF-induced proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell line, HuCCA-1. *World J Gastroenterol*. 2005 Oct 7;11(37):5845–52.
 77. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. Vol. 437, *Nature*. Nature Publishing Group; 2005. p. 497–504.
 78. Bernaschi P, Del Chierico F, Petrucca A, Argentieri A, Ciofi Degli Atti M, Ciliento G, et al. Microbial tracking of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital setting. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(2):463–72.
 79. Trapani S, Canessa C, Fedi A, Giusti G, Barni S, Montagnani C, et al. Macrophage activation syndrome in a child affected by malaria: The choice of steroid. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(2):535–9.
 80. Singh A, Stewart JM. Pathophysiology of diabetic macular edema. Vol. 49, *International Ophthalmology Clinics*. *Int Ophthalmol Clin*; 2009. p. 1–11.
 81. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, et al. Regulation of NF- κ B Signaling by Pin1-Dependent Prolyl Isomerization and Ubiquitin-Mediated Proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell*. 2003;12(6):1413–26.
 82. Albrecht U, Yang X, Asselta R, Keitel V, Tenchini ML, Ludwig S, et al. Activation of NF- κ B by IL-1 β blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human γ -fibrinogen gene. *Cell Signal*. 2007 Sep;19(9):1866–78.
 83. Ferrè S, Baldoli E, Leidi M, Maier JAM. Magnesium deficiency promotes a pro-atherogenic phenotype in cultured human endothelial cells via activation of NF κ B. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2010 Nov;1802(11):952–8.
 84. Bernot D, Peiretti F, Canault M, Juhan-Vague I, Nalbone G. Upregulation of TNF- α -induced ICAM-1 surface expression by adenylate cyclase-dependent pathway in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2005 Feb;202(2):434–41.
 85. Yang N, Zhang W, He T, Xing Y. Silencing of galectin-1 inhibits retinal neovascularization and ameliorates retinal hypoxia in a murine model of oxygen-induced ischemic retinopathy. *Exp Eye Res*. 2017 Jun 1;159:1–15.
 86. Freitag N, Tirado-González I, Barrientos G, Herse F, Thijssen VLJL, Weedon-Fekjær SM, et al. Interfering with Gal-1-mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 9;110(28):11451–6.
 87. Wu D, Kanda A, Liu Y, Kase S, Noda K, Ishida S. Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition. *FASEB J*. 2019;33(2):2498–513.
 88. Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ. TNFR1-induced NF- κ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal*. 2007 Jun;19(6):1238–48.

89. Mukwaya A, Jensen L, Lagali N. Relapse of pathological angiogenesis: functional role of the basement membrane and potential treatment strategies. Vol. 53, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2021. p. 189–201.
90. Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: Biology, pathology and therapeutic target. Vol. 23, *Trends in Neurosciences*. Trends Neurosci; 2000. p. 618–25.
91. Grazyna Malukiewicz, Joanna Stafiej, Hanna Lesiewska BS. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in diabetic retinopathy - PubMed [Internet]. [cited 2021 May 29]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29715408/>
92. Caroline de Freitas Zanon, Nathália Martins Sonehara, Ana Paula Girol, Cristiane Damas Gil SMO. Protective effects of the galectin-1 protein on in vivo and in vitro models of ocular inflammation - PubMed [Internet]. [cited 2021 May 29]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26392742/>
93. Felinski EA, Cox AE, Phillips BE, Antonetti DA. Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element. *Exp Eye Res*. 2008 Jun;86(6):867–78.
94. Saker S, Stewart EA, Browning AC, Allen CL, Amoaku WM. The effect of hyperglycaemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2014;121:161–7.
95. Choi MY, Jee D, Kwon JW. Characteristics of diabetic macular edema patients refractory to anti-VEGF treatments and a dexamethasone implant. *PLoS One*. 2019 Sep 1;14(9).
96. Shah J, Vaze A, Tang Lee Say T, Gillies MC, Fraser-Bell S. Emerging corticosteroid delivery platforms for treatment of diabetic macular edema. Vol. 25, *Expert Opinion on Emerging Drugs*. Taylor and Francis Ltd.; 2020. p. 383–94.
97. Hirose I, Kanda A, Noda K, Ishida S. Glucocorticoid receptor inhibits Müller glial galectin-1 expression via DUSP1-dependent and -independent deactivation of AP-1 signalling. *J Cell Mol Med*. 2019 Oct 1;23(10):6785–96.
98. Urbančić M, Topčić IG. Dexamethasone implant in the management of diabetic macular edema from clinician's perspective. Vol. 13, *Clinical Ophthalmology*. Dove Medical Press Ltd; 2019. p. 821–8.
99. Patil SD, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. *J Control Release*. 2007 Jan 22;117(1):68–79.
100. Mirabelli P, Peebo BB, Xeroudaki M, Koulikovska M, Lagali N. Early effects of dexamethasone and anti-VEGF therapy in an inflammatory corneal neovascularization model. *Exp Eye Res*. 2014;125:118–27.

Jo, Vitaliy Kogut, amb DNI 55486363J, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Previsió, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 01 de junio de 2021

(signatura)