



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

Programa de Segunda Especialización en Medicina Humana

**" Inhibición de neovascularización córnea con
bevacizumab intraestromal en un modelo animal"**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Título de Especialista en Oftalmología

AUTOR

Karin Flory ARELLANO CARO

ASESOR

Abelardo Augusto CUADRADO MONTES

Lima, Perú

2008



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Arellano K. Inhibición de neovascularización córnea con bevacizumab intraestromal en un modelo animal [Trabajo de Investigación]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2008.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Arenas Archila, por motivar en mí la investigación.

Al Dr. Abelardo Cuadrado, por su asesoría en el presente trabajo

A la **Dra. Carolina Pérez León**, por su apoyo en todo momento

A la **Dra. Leila Marroquí**, por las facilidades que me brindó en la patología.

Al Dr. Ruiz, por brindarme las facilidades para trabajar en el Centro de Cirugía Experimental del Hospital Rebagliati.

Al Dr. German Valenzuela, mi gran amigo médico y estadista

Y finalmente a mis padres y a mi esposo por su apoyo incondicional.

INDICE

I. RESUMEN

II. INTRODUCCIÓN

III. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS

V. DISCUSIÓN

VI. BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

PROPOSITO: Evaluar los efectos de la administración intraestromal de Bevacizumab (Avastin) en un modelo de neovascularización corneal en conejos.

METODOS: 10 conejos albinos (neozelandeses) con peso promedio 2.500 gr anestesiados con inyección intramuscular de ketamina 10 mg/Kg peso y tópica (Hidroclorato de Proparacaína 0.5%). Se colocaron 3 suturas con seda 7/0 a nivel de estroma corneal en cuadrante temporal superior en ambos ojos. Cuantificamos la formación de neovasos teniendo como referencia el tamaño de la sutura. Se evaluó los modelos experimentales en lámpara de hendidura en diferentes tiempos: antes de la inducción de la neovascularización, a los 3 días, a los 7 días, a los 14 días y a los 19 días cuando se colocó en Bevacizumab intraestromal: 0.1 ml (25mg/ml) en el ojo derecho, quedando el ojo izquierdo como control; y se evaluaron a los 7, 16 y 22 días post inyección. En éste último día se realizó la enucleación de ambos ojos que fueron llevados a anatomía patológica para ser evaluadas.

RESULTADOS: Del total de 8 conejos: 8 ojos derechos (casos) y 8 ojos izquierdos (controles) se obtuvo una media de 4.75 en número de neovasos corneales con una desviación estándar de 2.76, en comparación con los casos controles cuya media fue 9.25 con una desviación estándar de 3.99, datos estadísticamente significativos. En cuanto a la profundidad, 100% de los casos mostraron vasos superficiales mientras que 100% de los controles se hallaron en el estroma corneal profundo. En cuanto a la longitud del nevaso más largo se obtuvo una media de 1.18mm con una desviación de 0.70 versus una media de 2mm con 1.16 de desviación media, resultado que no resultó significativo. Otros datos tales como la hiperemia y el edema corneal no mostraron diferencias estadísticamente significativas por lo que no fueron relevantes para nuestro estudio

CONCLUSIONES: En nuestro modelo de neovascularización corneal el Bevacizumab (Avastin) intraestromal redujo significativamente en número y la profundidad de los neovasos corneales

Palabras Claves: Neovascularización corneal, Bevacizumab, Inhibidores de angiogénesis

INTRODUCCIÓN

La cornea mantiene su avascularidad como resultado de un balance entre factores angiogénicos y antiangiogénicos. Se cree que bajo condiciones basales, bajos niveles de factores angiogénicos y altos niveles de factores antiangiogénicos mantienen la cornea desprovista de vasos sanguíneos y linfáticos. El rompimiento de esta hemostasia puede producir condiciones patológicas produciendo neovascularización corneal y consecuentemente pérdida de transparencia corneal y de la protección inmune.(1, 2)

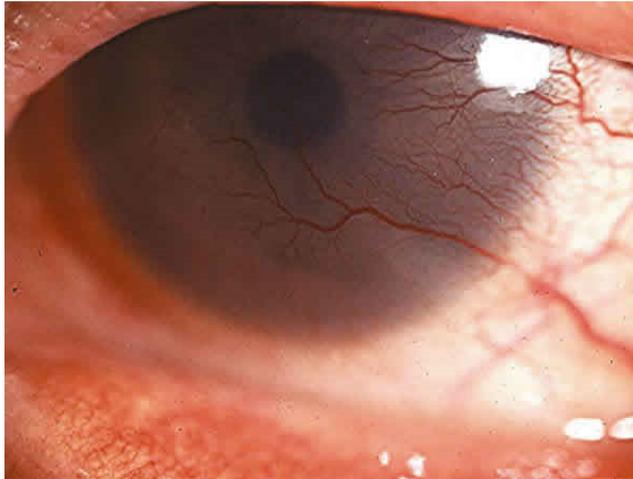


Figura 1. Neovascularización Corneal

Aunque varios compuestos han sido identificados como inhibidores en modelos experimentales y clínicos de neovascularización corneal que incluyen esteroides, antiinflamatorios no esteroideos, heparina, ciclosporina, metrotexate y talidomida; los esteroides han permanecido como el principal tratamiento en la práctica médica de la neovascularización corneal y del rechazo de trasplante corneal. Sin embargo los esteroides no son siempre efectivos y traen consigo muchos efectos adversos tales como glaucoma, infecciones y formación de cataratas (3). Es así como se está buscando otras formas de inhibición de la neovascularización y basándose en la fisiopatología de la inhibición de

VEGF por agentes anti- VEGF ha demostrado ser efectivos enlenteciendo o inhibiendo el crecimiento de los neovasos corneales (4, 5).

El mejor entendimiento de la fisiopatología de la angiogénesis ha permitido el desarrollo de compuestos activos que puedan interrumpir la cascada angiogénica. Identificando como el principal, pero no el único responsable está el VEGF, tal es así que las investigaciones fueron orientadas a diseñar drogas dirigidas a bloquear su acción con diferentes estrategias. Actualmente se encuentran disponibles en el mercado mundial medicamentos como el Pegaptanib, Ranibizumab y Bevacizumab. Los dos primeros aprobados para su uso oftalmológico y respaldados por ensayos clínicos. Estos actúan uniéndose a todas las isoformas de VEGF o a alguna de ellas para evitar su acción con el receptor. Otras drogas en fase de investigación son el VEGF- trap, los agentes pequeños de interferencia con ARN del VEGF (siRNA) y agentes contra otros dos mediadores de la angiogénesis como la ruboxistaurina que bloquea la PKC beta.(6, 7).

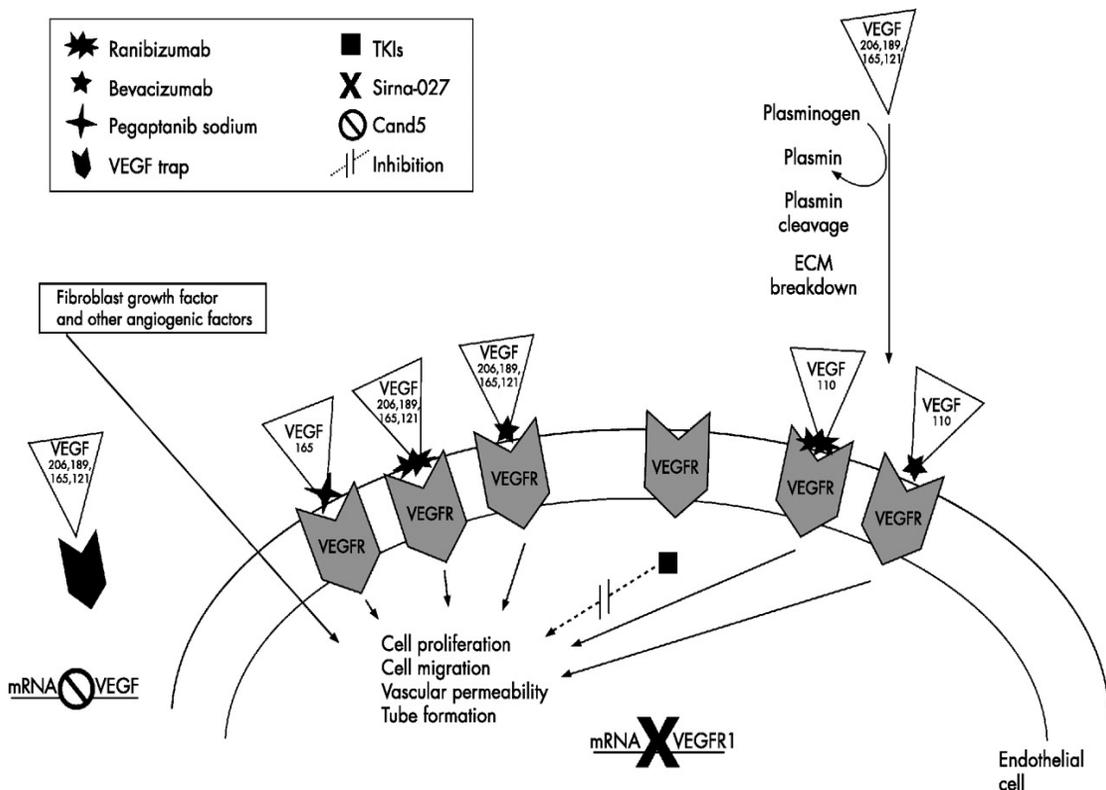


Figura 2: Receptores de los principales Antiangiogénicos

El Bevacizumab, AVASTIN, es un anticuerpo monoclonal completo que inhibe todas las isoformas de Factor de crecimiento vascular endotelial mediante su unión a dos puntos del mismo, producido por tecnología de ADN en células ováricas de hamsters chinos. Se une al factor de crecimiento vascular VEGF, inhibiendo así la unión de este a sus receptores VEGFR 1 y VEGFR 2, situados en las superficies de las células endoteliales. Al neutralizar la actividad biológica del VEGF se reduce la vascularización (4).

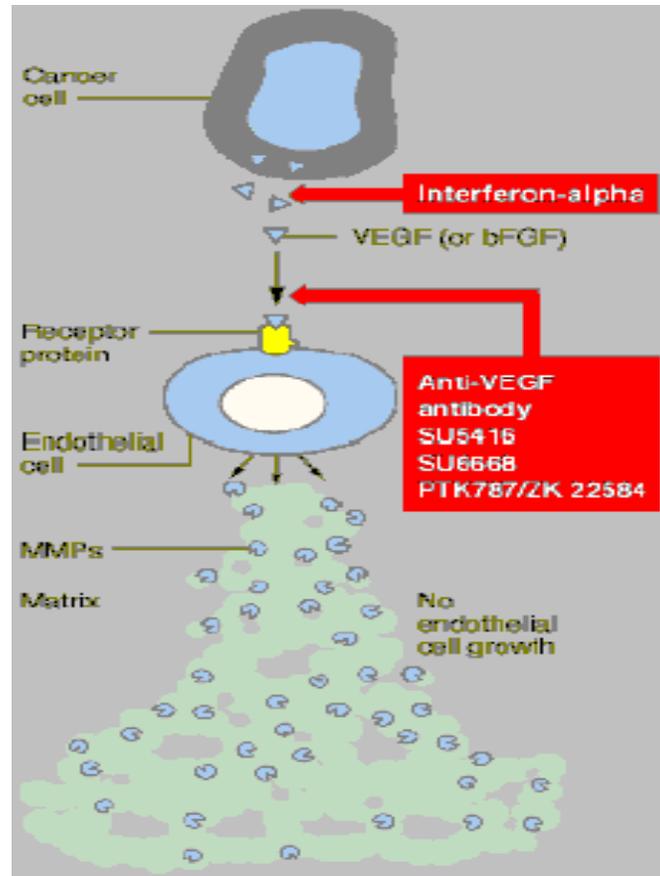


Figura 2: Anti-VEGF uniéndose a receptores de células endoteliales.

El Bevacizumab fue ideado inicialmente para uso oncológico. La FDA ha autorizado el uso del Bevacizumab como anticancerígeno para tratar el cáncer de colon rectal metastático, sin tratamiento previo, ya que aumenta considerablemente la supervivencia de dichos pacientes pero aun no ha sido autorizada para su uso oftalmológico (8). Sin embargo los resultados de un estudio piloto realizado por un equipo de la Bascon Palmer Eye Institute, de la

Universidad de Miami (USA), demostraron que la administración por vía intravenosa del Avastin mejoraba la agudeza visual al reducir el escape de los vasos sanguíneos anormales, bloqueando el factor de crecimiento endotelial . Administrándose como inyección intravítrea reduce las complicaciones sistémicas. En pacientes con retinopatía diabética proliferativa una inyección intravítrea induce a una rápida regresión de la neovascularización de la retina y del iris . Si los pacientes necesitan intervención quirúrgica una inyección de bevacizumab antes de la vitrectomía reduce las potenciales fugas. El fármaco es capaz de penetrar la fovea recomendándose que se inyecte 3 a 10 días antes de la cirugía (9, 10, 11, 12, 13).

El destacado rol del VEGF en la fisiopatología de la neovascularización corneal ha sido demostrado en modelos animales de neovascularización corneal tanto en queratitis por herpes simple como en botones corneales humanos. Además anti VEGF al parecer mediante su proteína de RNA ha demostrado reducir la neovascularización corneal y mejorar la supervivencia de los trasplantes corneales en modelos animales.(14, 15, 16, 17).

Estudios experimentales publicados por la asociación europea para la visión concluyen que Bevacizumab tópico como sistémico inhibían la inflamación mediada por angiogénesis y linfangiogénesis en la cornea.(14, 18).

El epitelio corneano proporciona una barrera inicial a la penetración de fármacos y electrolitos hidrosolubles por su naturaleza lipofílica y sus estrechas uniones a base de desmosomas intercelulares, lo que limita la absorción de sustancias ionizadas hidrófilas. El estroma corneano con su naturaleza hidrófila actúa como barrera para fármacos en solventes lipídicos, que son los que mejor penetran el epitelio (19). En esta forma vemos que existe cierta dificultad para que un medicamento actúe en forma completa en el estroma profundo, ya que si es hidrofílico no penetra el epitelio y si es liposoluble no se difunde en el estroma. Si le agregamos a lo anterior la falta de vascularización de la córnea que impide que sustancias usadas por vía parenteral o subconjuntival circulen libremente dentro del estroma.

De la experiencia que se ha obtenido con la inyección de aire en el estroma corneano para facilitar la disección en las queratoplastias lamelares, se aprendió que sustancias inyectadas intraestromalmente se difunden fácilmente, y tienden a desaparecer (2). Así mismo hay

experiencia con la aplicación de corticoides inyectados directamente en el estroma de la córnea a dosis mínimas como cristales de depósito en el tratamiento del rechazo al trasplante corneano. (19).

Es así como surge la idea de crear un modelo experimental de neovascularización corneal que nos permitiera evaluar los efectos del Bevacizumab intraestromal, modelo que fuera accesible y que nos permitiera cuantificar nuestros resultados. A pesar de los inconvenientes que encontramos para la realización del estudio, puesto que la investigación basada en modelos animales es poco usada en nuestro país por nuestros bajos recursos, pudimos sobrepasar nuestras expectativas realizando por primera vez un trabajo de investigación propiamente dicho de cirugía experimental en nuestro Hospital.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se presenta un estudio experimental doble ciego consistente en la inducción de neovascularización corneal en ojos de conejo mediante la colocación de suturas intraestromales, medición de la neovascularización y posterior evaluación de la inhibición de neovasos con Avastin

La muestra incluyó 10 conejos machos albinos(neozelandeses) con peso promedio 2.500 gr, previa evaluación oftalmológica con linterna habiéndose descartado alguna patología ocular, obtenidos de la Universidad Agraria de La Molina, donde fueron criados exclusivamente para nuestro estudio; siendo llevados al ambiente de cirugía experimental (ambiente de animales menores) del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins y distribuyéndolos en tres jaulas de metal amplias contando con adecuada ventilación, iluminación, y cuidado por personal entrenado de la institución. Los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo a las normas de la Asociación para la investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) (20).



Figura 4: Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Edgardo Rebagliati ESSALUD



Figura 5: Especímenes de Investigación en Ambiente para Animales Menores de Cirugía Experimental del del Hospital Rebagliati

Por las similitudes que existen entre el ojo de conejo y el humano y la facilidad de manipulación se escogió a este animal como modelo

Para el estudio se tomaron los 20 ojos de dichos especímenes. En ambos ojos se realizó el modelo de neovascularización corneal para luego tomar el ojo derecho para la administración de Avastin y el ojo izquierdo como control.

Durante el estudio fallecieron 2 especímenes, los que fueron excluidos del estudio, por lo que a partir de ahora hablaremos de 8 conejos; dicho hecho no modificó nuestro estudio.

Variables del Estudio

Independiente

- Peso

Dependiente

- Longitud de neovaso de mayor longitud
- Número de neovasos en cuadrante temporal superior
- Profundidad de los neovasos
- Edema corneal
- Hiperemia conjuntival

Las variables longitud de neovaso, edema e hiperemia se evaluaron en lámpara de hendidura
Las variables número de neovasos y profundidad de neovasos se evaluaron con patología
El peso en gramos de los conejos no fue significativo ya que fueron muy similares.

Modelo neovascularización corneal:

Cada animal fue anestesiado con inyección intramuscular de ketamina 10 mg/Kg peso y tópica (Hidroclorato de Proparacaína 0.5%). Colocándose 3 suturas con seda 7/0 a nivel de estroma corneal en cuadrante temporal superior desde el limbo de aproximadamente 3mm y en ambos ojos bajo microscopio.

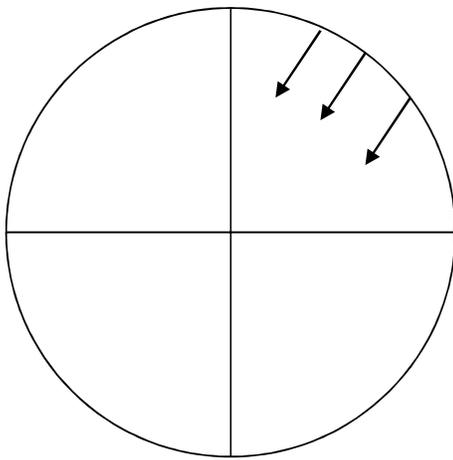


Figura 6: Esquema de Colocación de Sutures Intraestromales Ojo Izquierdo

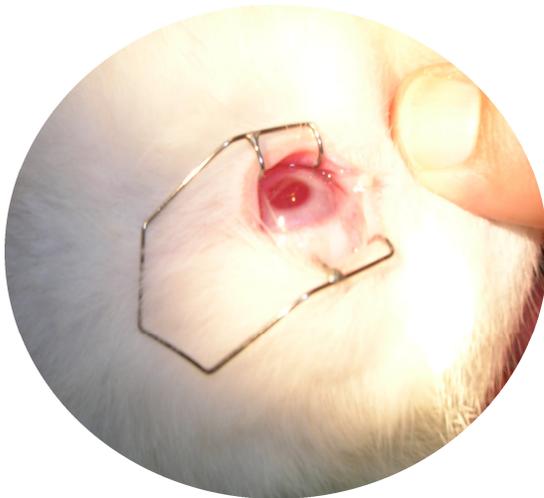


Figura 7: Ojo de conejo con blefaróstato

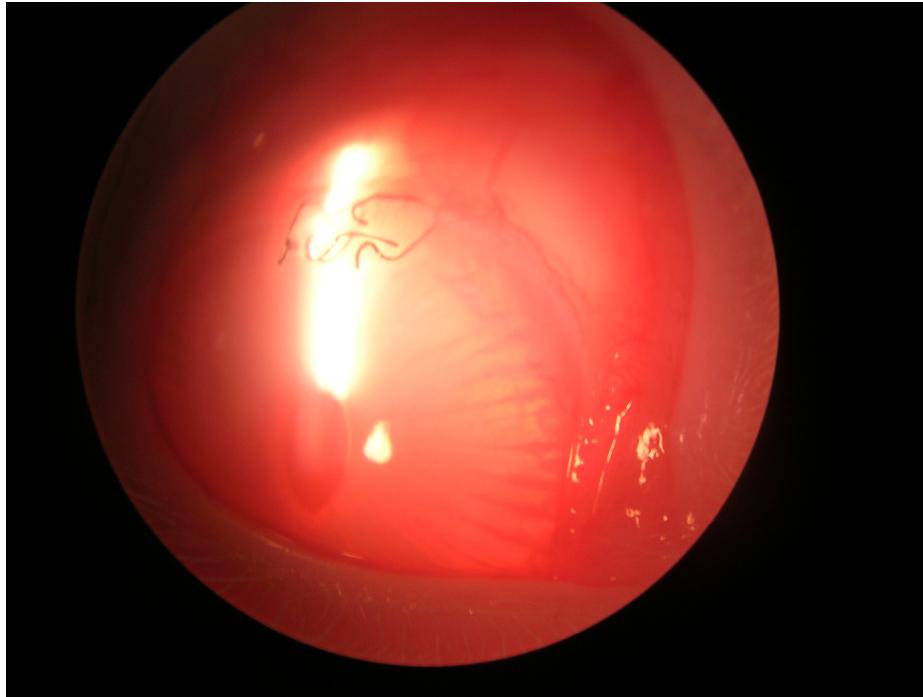


Figura 8: Ojo con suturas

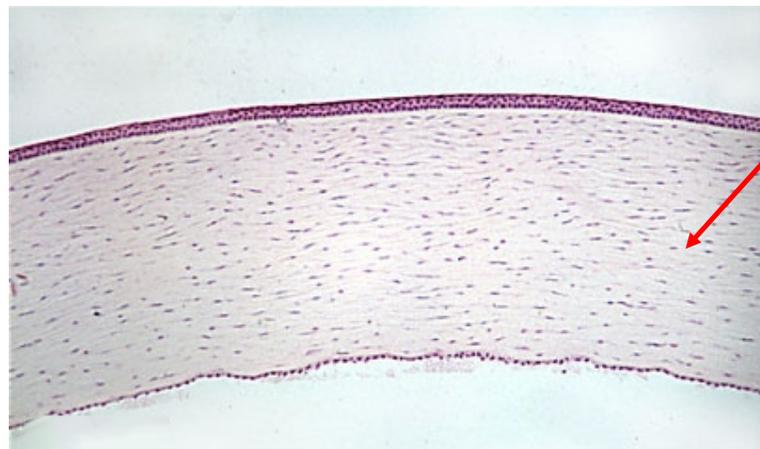


Figura 9: Capas de la Cornea y lugar de aplicación de la inyección en el estroma corneal

Cuantificación de la Neovascularización:

Cuantificamos la formación de neovasos midiendo el neovaso más largo con un compás y teniendo como referencia el tamaño de la sutura, el número de neovasos y la profundidad de neovasos.

Se evaluó los modelos experimentales en lámpara de hendidura por dos observadores en diferentes tiempos antes de la inducción de la neovascularización, a los 3 días, a los 7 días, a los 14 días y a los 19 días cuando se colocó en Bevacizumab intraestromal: 0.1 ml (25mg/ml) en el ojo derecho, quedando el ojo izquierdo como control; y a los 7 y 16 días post Avastin y a los 22 días cuando se realizó la enucleación de ambos ojos que fueron llevados al Laboratorio de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Oftalmología (INO), para ser evaluados.

Técnica de infiltración intralesional de Bevacizumab:

La inyección se realizó bajo microscopio

Bevacizumab 0.1ml (25mg/ml) preparado en una jeringa de insulina con aguja 27G.

Se coloca previamente anestesia tópica con Proparacaína al 0.5% e inyección intramuscular de ketamina 10 mg/Kg peso

Bevacizumab inyectado en el estroma corneal cerca de los neovasos. Se dio una inclinación de 45° a la aguja para comodidad del operador tal como se muestra en las ilustraciones.

Después de la inyección se aplica antibiótico tópico

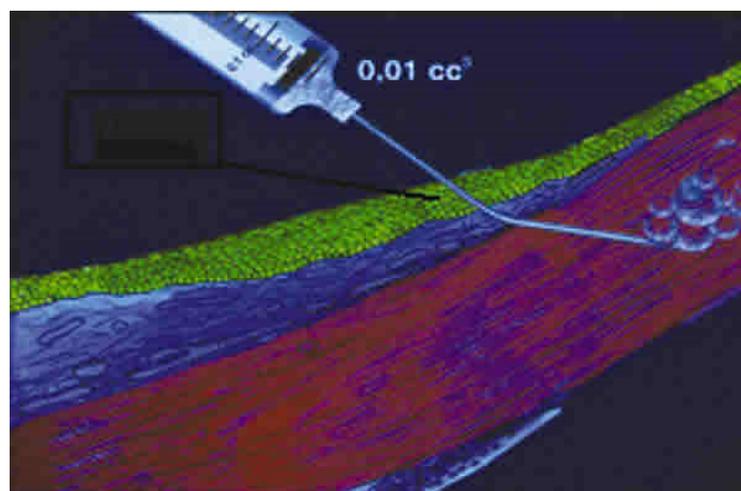


Figura 10: Bevacizumab Intraestromal 0.1ml (25 mg/ml)

Penetrando el epitelio y por debajo de la capa de Bowman dentro del estroma

Técnica de Enucleación de los ojos en estudio:

Al día 22 post inyección se realizó la eutanasia de los animales en estudio utilizando una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico bajo anestesia produciéndose un paro cardiorrespiratorio.

Se enuclean los dos ojos en estudio con la técnica habitual: Peritomía en 360°, se individualizan rectos y se seccionan desde su inserción anterior pasando a seccionar por último el nervio óptico.

Los ojos fueron fijados con formaldehído al 10% por 24 horas y luego procesados para su tinción con hematoxilina-eosina y PAS

Las secciones fueron examinadas dividiendo la córnea en dos mitades y evaluadas según el número de neovasos y profundidad de neovasos bajo microscopio

Análisis Estadístico:

El análisis se realizó con el programa SPSS versión 16.00. Todas las variables cuantitativas fueron examinadas con la prueba de Kolmogorov-Smirnow para evaluar su distribución con respecto a la media, usada en estudios con muestras pequeñas. Las variables cuantitativas se expresan como media y desviación estándar si tuvieran distribución normal., o mediante mediana y rango intercuartílico si no tuvieran esta distribución. En función a ello, para la comparación de los grupos se emplearon las pruebas T de Student y U de Mann Whitney. Las variables cualitativas se expresan en porcentajes, pudiendo haberse originado en variables cuantitativas. Las diferencias entre grupos se efectuaron mediante la prueba de Chi cuadrado.

Para todos los casos se escogió un nivel de significancia estadística menor del 5% como significativo.

RESULTADOS

Del total de 8 conejos : 8 ojos derechos (casos) y 8 ojos izquierdos (controles) se obtuvo que el Bevacizumab (Avastin) redujo significativamente el número de neovasos corneales, encontrándose más superficiales comparados con los casos control, dichas variables tomadas de los resultados anatomopatológicos.

Así obtuvimos una media de 4.75 en número de neovasos corneales con una desviación estándar de 2.76, en comparación con los casos controles cuya media fue 9.25 con una desviación estandar de 3.99, datos que fueron valorados con T de Student obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

En cuanto a la profundidad 100% de los casos mostraron vasos superficiales mientras que 100% de los controles se hallaron en el estroma corneal profundo; para lo que se dividió previamente el estroma corneal en 50% estroma superficial y 50% estroma profundo. Esta variable se valoró con test de Chi cuadrado siendo estadísticamente significativo ($p > 0.005$)

Profundidad*	Casos	Controles
Superficial	100%	0
Profundo	0	100%

Chi cuadrado: 16.50 $p < 0.005$

Tabla 1: Análisis de Profundidad de Neovasos

Número de vasos : media (DS)	Casos	Controles
	4.75 (2.76)	9.25 (3.99)*

*T de Student: -2.622, $p < 0.05$

Tabla 2: Análisis de Número de Neovasos

ANATOMIA PATOLÓGICA

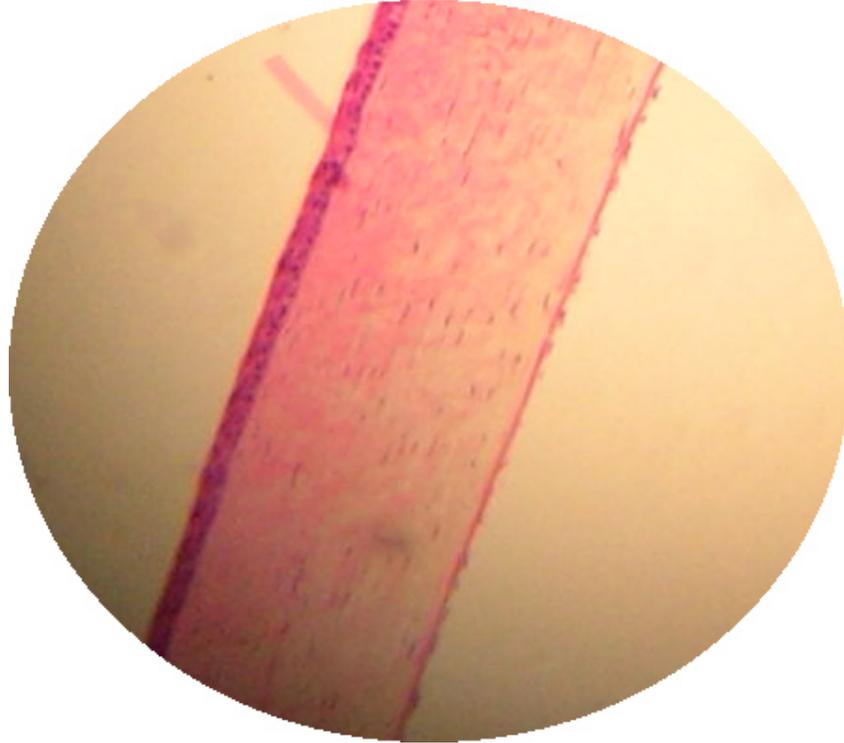


Figura 11: Corte Histológico de Cornea Normal de Conejo con Hematoxilina Eosina de estudio piloto (sin suturas)

CONEJO 1:

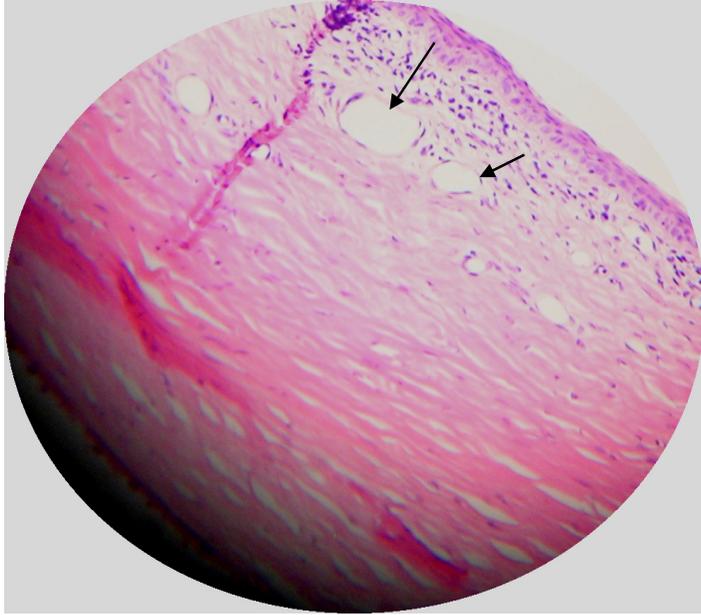


Figura 12: Con Avastin

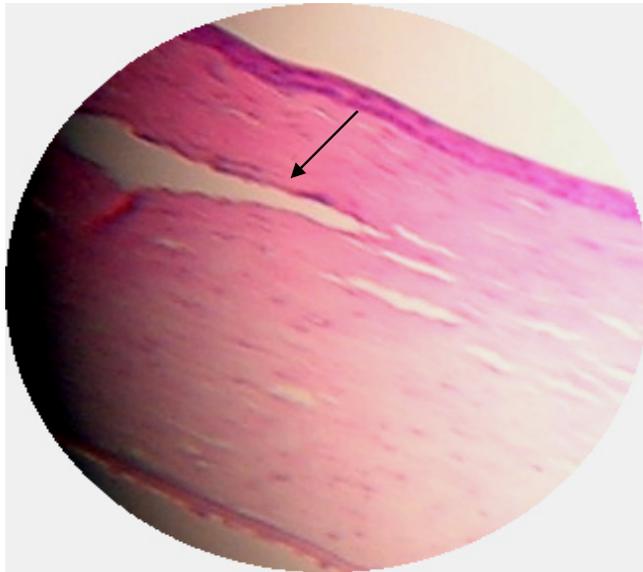


Figura 13: Sin Avastin

CONEJO 2:

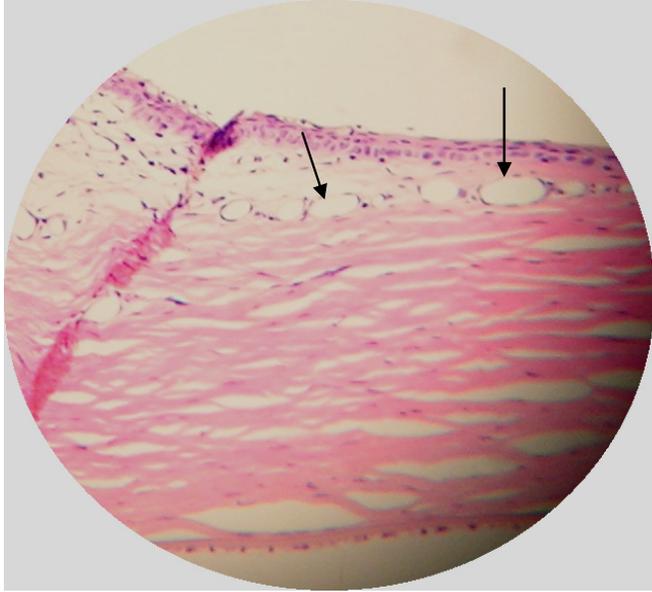


Figura 14: Con Avastin

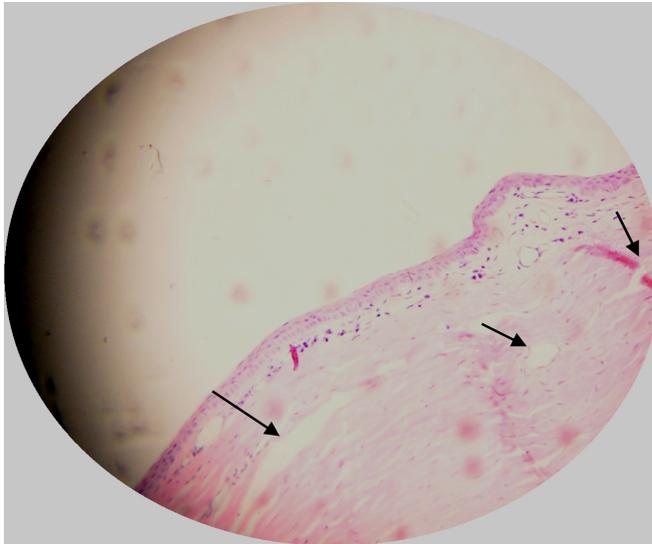


Figura 15: Sin Avastin

CONEJO 3:

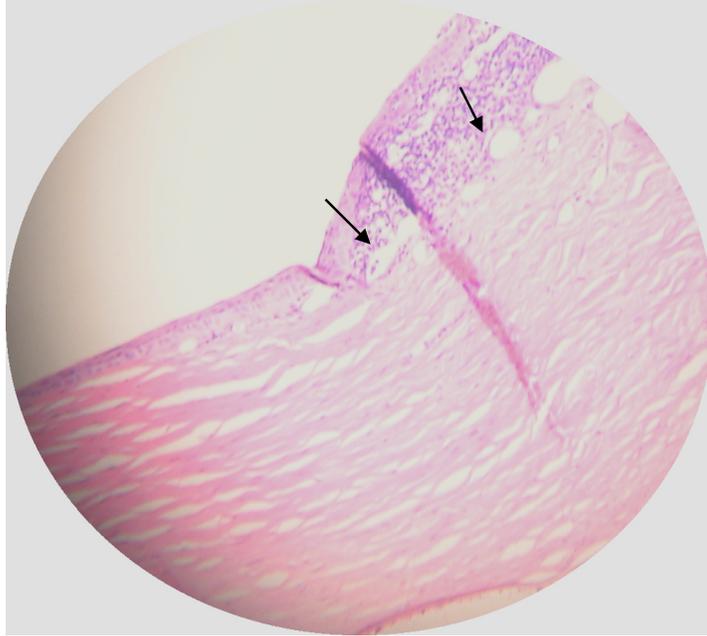


Figura 16: Con Avastin

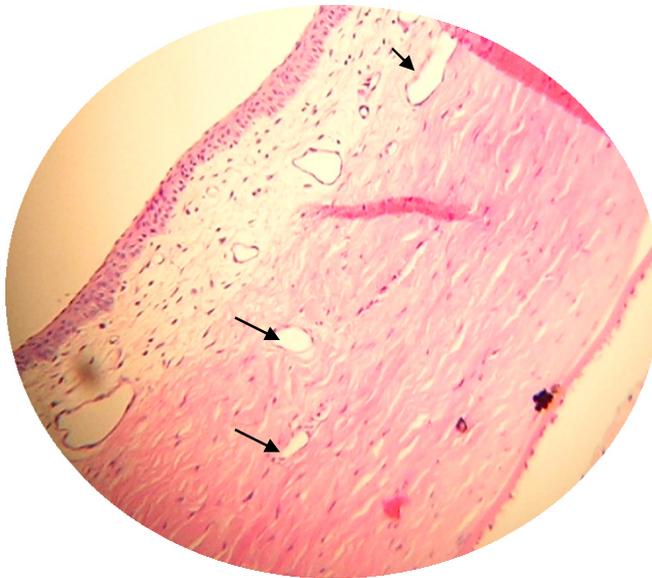


Figura 17: Sin Avastin

CONEJO 4:

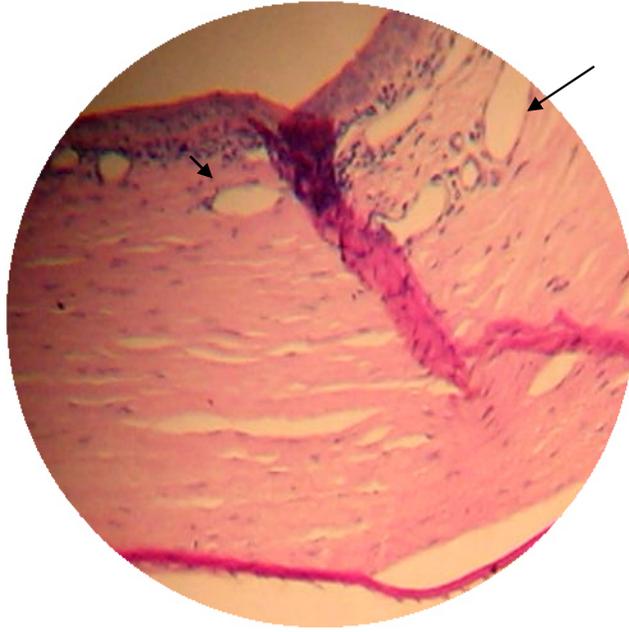


Figura 18: Con Avastin

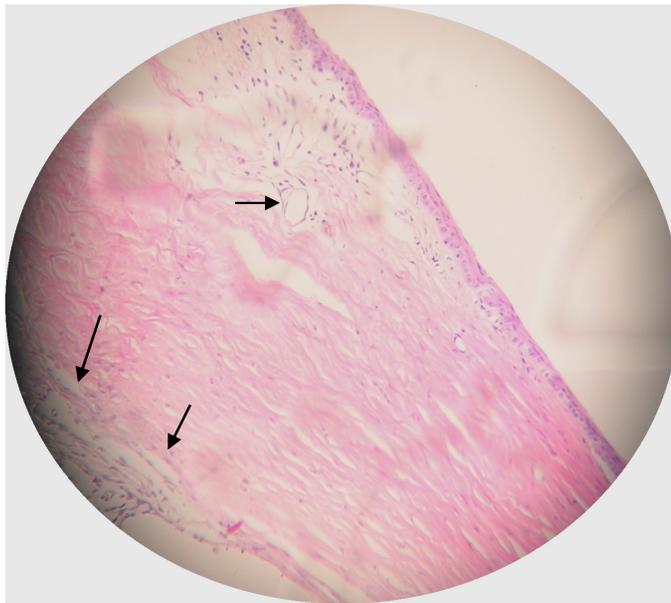


Figura 19: Sin Avastin

CONEJO 5:

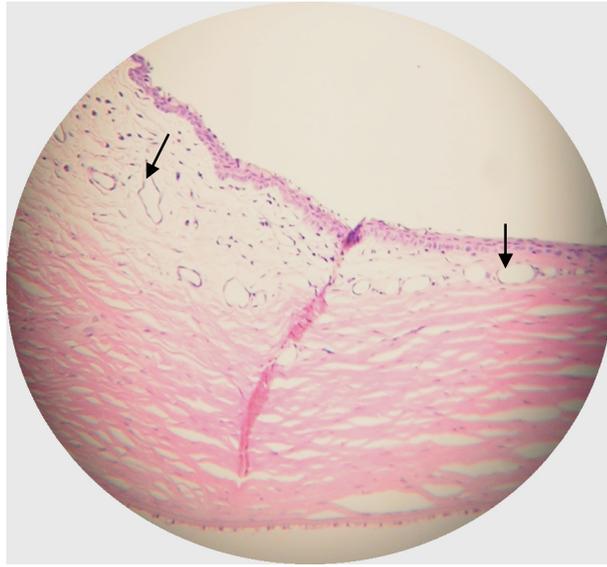


Figura 20: Con Avastin

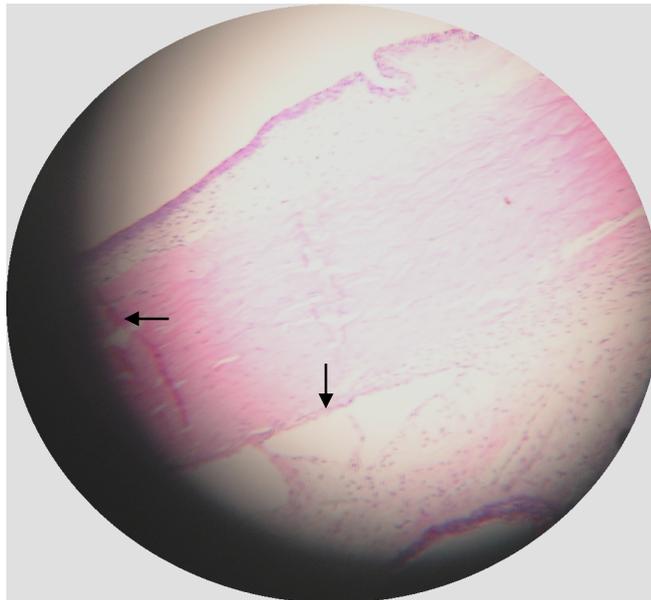


Figura 21: Sin Avastin

CONEJO 6:

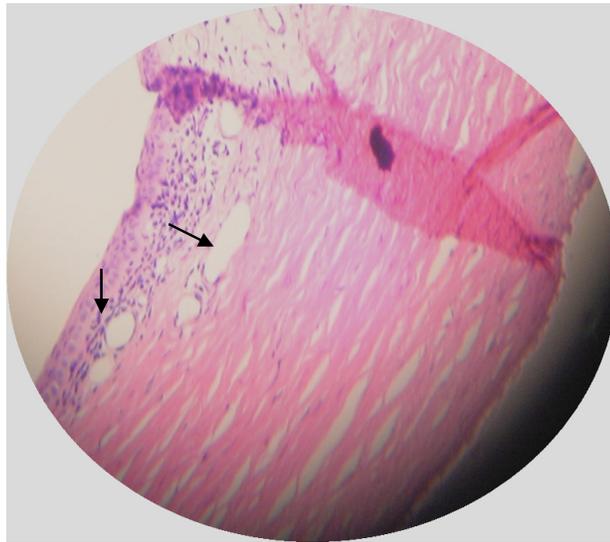


Figura 22: Con Avastin

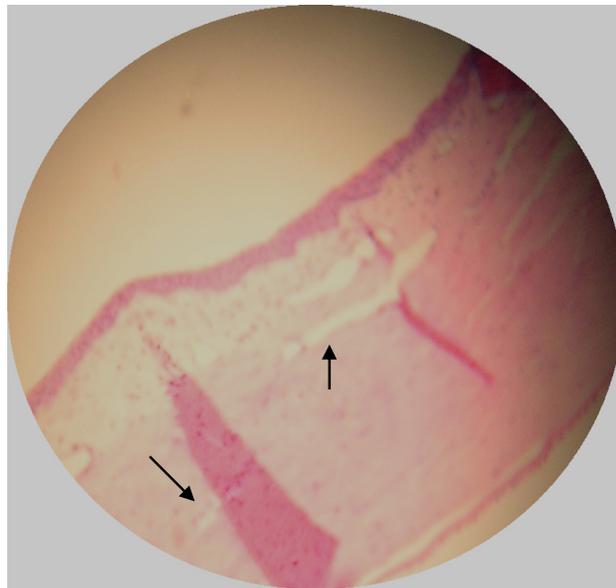


Figura 23: Sin Avastin

CONEJO 7:

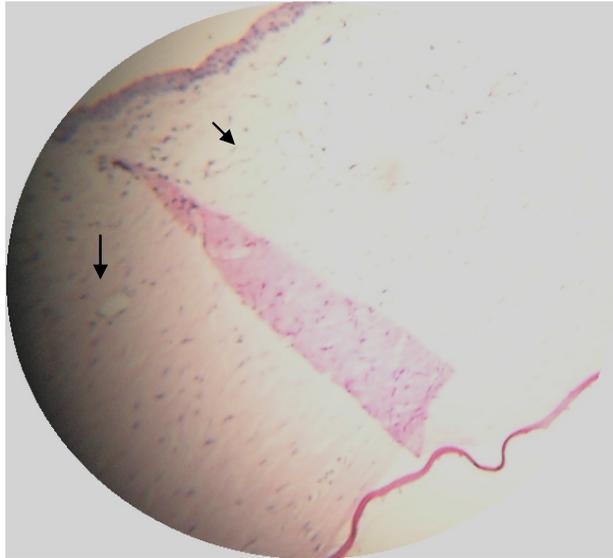


Figura 24: Con Avastin

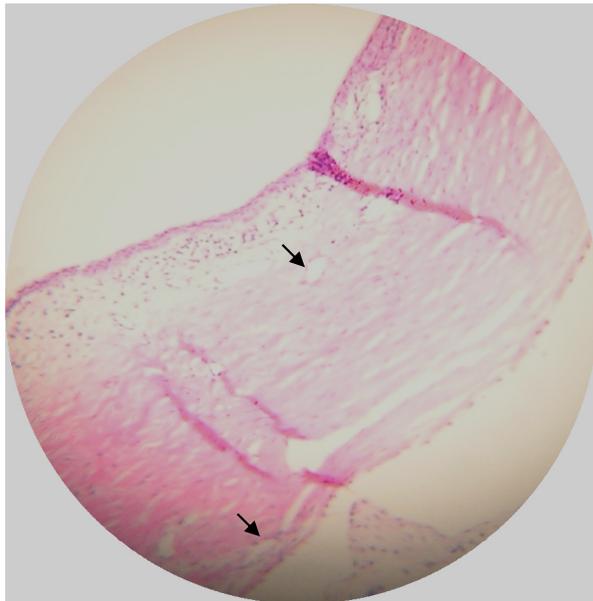


Figura 25: Sin Avastin

CONEJO 8:

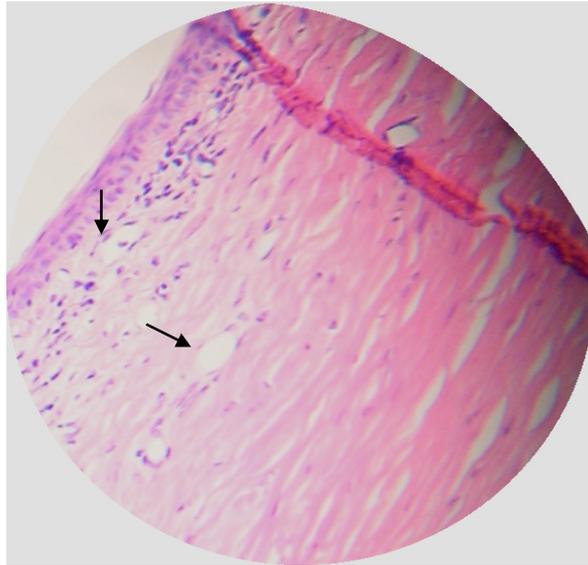


Figura 26: Con Avastin

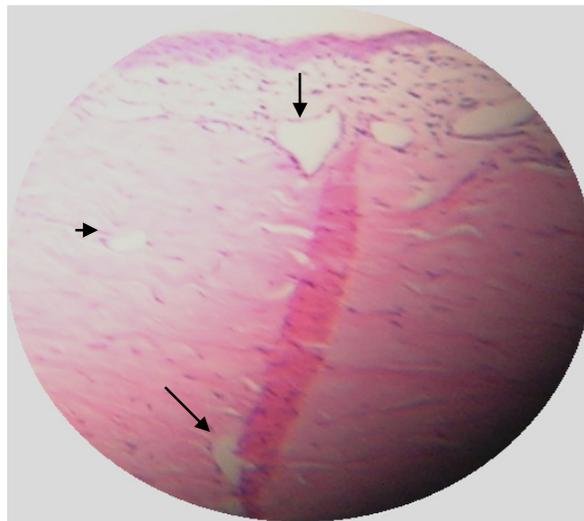


Figura 27: Con Avastin

	T2: 1 Sem			T4: 19 días			T6: 16 días Post Avastin		
	Long Neovaso	Edema	Hiperemia	Long. Neovaso	Edema	Hiperemia	Long Neovaso	Edema	Hiperemia
CONEJO 1	Caso 1 mm	+	+	2.5 mm	++	++	0.5 mm	++	++
Control	1mm	+	+	3mm	++	++	3 mm	++	++
CONEJO 2	Caso 1 mm	+	+	2 mm	+	+	0.5 mm	+	+
Control	2mm	+	+	2mm	+	+	0.5 mm	+	+
CONEJO 3	Caso 1 mm	+	+	1.5 mm	++	++	0.5 mm	+	+
Control	1 mm	+	+	1.5 mm	++	++	1 mm	+	+
CONEJO 4	Caso 0 mm	++	++	2 mm	++	+	1 mm	+	+
Control	1 mm	++	++	3 mm	++	+	2 mm	+	+
CONEJO 5	Caso 2 mm	+	+	2mm	++	+	1mm	+	+
Control	1 mm	+	+	2mm	++	+	2.5mm	++	++
CONEJO 6	Caso 1 mm	+	+	2.5 mm	++	+	2 mm	+	+
Control	1 mm	+	+	2 mm	++	+	1 mm	+	+
CONEJO 7	Caso 1 mm	+	+	3 mm	++	+	2 mm	+	+
Control	1mm	+	+	3 mm	++	+	4 mm	+	+
CONEJO 8	Caso 1.5 mm	+	++	2 mm	+	+	2 mm	+	+
Control	1 mm	+	++	1.5 mm	+	+	2 mm	+	+

Tabla 3: Resultados de los parámetros evidenciados en biomicroscopia

La longitud del neovaso más largo no disminuyó significativamente después de 16 días de inyección intraestromal de Avastin



Figura 29: Ojo con Avastin

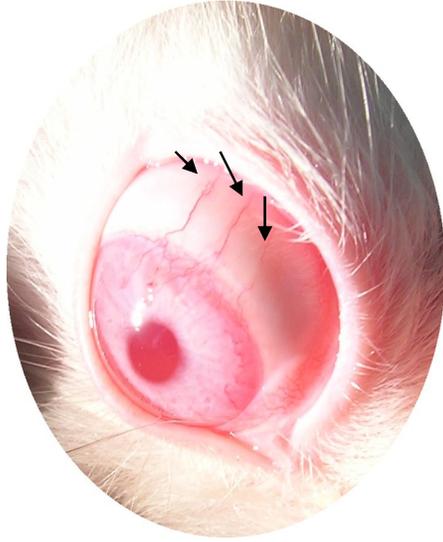
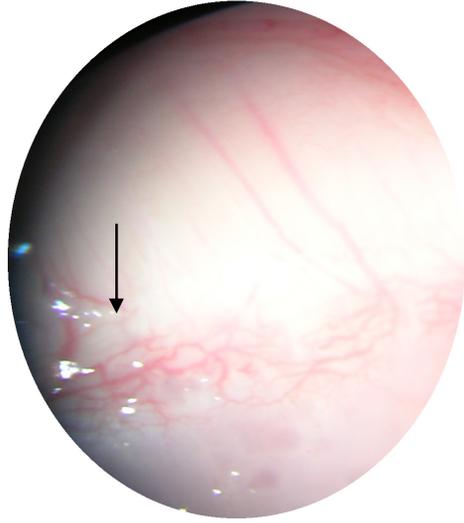


Figura 28: Ojo Con Avastin



En cuanto a la longitud del neovaso más largo se obtuvo una media de 1.18mm con una desviación de 0.70 versus una media de 2mm con 1.16 de desviación media, resultado que no resultó significativo.

	Casos	Controles
Longitud de vasos : media (DS)	1.18 (0.70)	2 (1.16) ⁺

⁺T de Student: -1.688, p NS

Tabla 4: Análisis de la Longitud del neovaso más largo

Otros datos tales como la hiperemia y el edema corneal no mostraron diferencias estadísticamente significativas por lo que no fueron relevantes para nuestro estudio

Edema ⁺	Casos	Controles
Leve	100%	87.5%
Moderado	0	0
Severo	0	12.5%

⁺ Chi cuadrado: 0.00 p NS

Tabla 5: Análisis del Edema Corneal

Hiperemia ⁺	Casos	Controles
Leve	100%	87.5%
Moderada	0	12.5%
Severa	0	0%

⁺ Chi cuadrado: 1.067 p NS

Tabla 6: Análisis del la Hiperemia Conjuntival

DISCUSIÓN

Ciclosporina A y esteroides tópicos han sido las principales drogas disponibles para la inhibición de angiogénesis. Corticosteroides reducen la inflamación y la infiltración de leucocitos produciendo inhibición. Ciclosporina A inhibe cicloxigenasa (COX-2) y la activación y proliferación de células T.(3)

Sin embargo los mecanismos indirectos de estos dos inmunomoduladores tienen efecto limitado, los esteroides no son siempre efectivos y traen consigo muchos efectos adversos tales como glaucoma, infecciones y formación de cataratas. Es así como se está buscando otras formas de inhibición de la neovascularización corneal y se ha demostrado que dos de los principales factores que intervienen en el mecanismo de antiangiogénesis corneal son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el Factor activador de Plaquetas (PAF). Basándose en la fisiopatología de la inhibición de VEGF por agentes anti- VEGF se realizan hoy en día numerosos estudios que tratan de demostrar la eficacia de estos antiangiogénicos en neovascularización en oftalmología.(4, 6, 7)

La terapia antiangiogénica puede ser dividida en tres categorías: Angiostático/Antiangiogénico que detienen el crecimiento de nuevos vasos (los angiogénicos clásicos), Angioregresiva con regresión de vasos patológicos y angioclusivo como oclisor temporal de vasos usualmente como prequirúrgico.(18)

Bevacizumab, es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado completo que inhibe todas las isoformas de Factor de crecimiento vascular endotelial mediante su unión a dos puntos del mismo. Se une al factor de crecimiento vascular VEGF, inhibiendo así la unión de este a sus receptores VEGFR 1 y VEGFR 2, situados en las superficies de las células endoteliales. Al neutralizar la actividad biológica del VEGF se reduce la vascularización de los tumores, y por lo tanto se inhibe el crecimiento del tumor. Bevacizumab fue aprobado por la FDA en el 2004 como tratamiento de primera línea en pacientes con cáncer colorectal metastático y en la actualidad es usado en el tratamiento de formas de neovascularización relacionadas a la edad.(8, 11, 13)

El destacado rol del VEGF en la fisiopatología de la neovascularización corneal está siendo demostrado en modelos animales de neovascularización corneal con quemadura corneal por alcali. (29, 30, 31). Además anti AVEGF al parecer mediante su proteína de RNA ha demostrado reducir la neovascularización corneal y mejorar la supervivencia de los trasplantes corneales en modelos animales.(8). Este estudio se basa en un modelo de neovascularizaación con suturas, el cual permite una neovascularización más regular y medible.

Así, nuestros resultados sugieren que Avastin (Bevacizumab) inhibe parcialmente la neovascularización corneal en nuestro modelo en conejos, basándonos en las reducciones estadísticamente significativas en cuanto al número y profundidad de neovasos corneales evaluados en las muestras de patología. Resultados que podemos comparar con otros estudios; la mayoría de ellos muestra una disminución del área de neovascularización y el calibre de los neovasos evidenciando una parcial reducción en la neovascularización corneal (26, 30, 32, 34). No evidenciamos disminución significativa en la longitud del neovaso de mayor a diferencia de un estudio con modelo de neovascularización inducido por quemadura alcalina (32), pero si disminución de los vasos menores resultados comparables con otro estudio (27).

Estudios realizados en pacientes señalan que cuanto más pronto se aplique el antiangiogénico se obtendrían mejores resultados que serían visibles a partir del mes de la aplicación y sin mostrar efectos adversos locales ni sistémicos (26, 30)). En este estudio se aplicó el Avastin a los 19 días de la inducción de neovasos con suturas y a partir de ahí hicimos un seguimiento hasta el día 17 donde fueron enucleados.

En cuanto a la vía de administración, Bevacizumab en gotas ha probado eficacia y seguridad en la limitación de neovascularización corneal en modelos experimentales en animales (33). La vía subconjuntival también está siendo probada con buenos resultados (17, 26, 27). En el presente estudio, la inyección del Bevacizumab intraestromal se considera como una buena alternativa en el tratamiento de la angiogénesis corneal; una técnica segura y práctica y sin efectos sistémicos. En Sao Paulo, la Dra. Ana Carolina Cabreira Vieira reportó una serie de casos de pacientes con inyecciones intraestromales de Bevacizumab con resultados en que colocan a esta droga como una terapia antiangiogénica opcional para la neovascularización corneal (21)

Esta técnica surge de la experiencia que se ha obtenido con la inyección de aire en el estroma corneano para facilitar la disección en las queratoplastias lamelares, se aprendió que sustancias inyectadas intraestromalmente se difunden fácilmente, y tienden a desaparecer (11). Así mismo hay experiencia con la aplicación de corticoides inyectados directamente en el estroma de la córnea a dosis mínimas como cristales de depósito en el tratamiento del rechazo al trasplante corneano.(19) .

Encontramos también reportes en los cuales se está usando Bevacizumab en casos de queratitis estromal herpética, pterigion recurrente y síndrome de Stevens Johnson con buenos resultados (26, 30, 34).

En conclusión, aunque los resultados del estudio sugieren una parcial regresión de la neovascularización corneal. El Avastin intraestromal ofrece una buena alternativa, que si bien es cierto requiera un mayor seguimiento acerca del intervalo, dosis y efectos a largo plazo ; éste sería el inicio para posteriores estudios multicéntricos rdbdomizados que nos ayudarían a tener mayor información acerca del tratamiento y control de la neovascularización corneal sobre todo en pacientes de riesgo, como los transplantados corneales.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Chang J-H; Gabison EE ; Kato T et al. Corneal Neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 242-249.
2. John P. Whitcher, M. Srinivasan & Madan P. Upadhyay: Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the World Health Organization* 2001, 79: 214-221.
3. Tomohiko Usui MD, Kenji Sugisaki MD, Woo-Dong Jang PhD, Nobuhiro Nishiyama PhD, and Kazunori Kataoka PhD: New drug delivery for corneal neovascularization using polyion complex micelles. *Cornea* 2005; 24(Suppl. 1): S39-S42.
4. Kvanta A. Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84: 282-288.
5. C. Cursiefen, C. Hofmann-Rummelt, M Kuchle, U Schlötzer-Schrehardt: Pericyte recruitment in human corneal angiogenesis: an ultrastructural study with clinicopathological correlation. *Br. J. Ophthalmol* 2003;87:101-106.
6. Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, Schingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22: 1-29.
7. Van Wijngaaden P, Coster DJ, Williams KA. Inhibitors of Ocular Neovascularization. Promises and Problems. *JAMA* 2005; March 23/30 293(12); 1509-1513.
8. Hurwitz H; Fehrenbacher L; Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350 (23): 2335-2342.
9. Avery R; Pieramici D; Rabena M et al. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol* 2006; 113: 363-372.
10. Avery R ; Pearlman J ; Pieramici D et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmol* 2006; 113(10): 1695.
11. [Avery RL](#). Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. [Retina](#) 2006; 26(3): 352-4.

12. Pai S.A; Shetty R; Vijayan P et al. Clinical, Anatomic, and Electrophysiologic Evaluation Following Intravitreal Bevacizumab for Macular Edema in Retinal Vein Occlusion. *Am J Ophthalmol* 2007; 143 (4): 601-6.
13. Bom Aggio F; Farah ME; Silva WC et al. Intravitreal bevacizumab for exudative age-related macular degeneration after multiple treatments. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245 (2): 215-220.
14. Emiliano S.Lopez, J. Oscar Croxatto, Anders Kvanta, Juan E. Gallo: Efecto de Bevacizumab(Avastin) y Suramina en un modelo animal de neovascularización corneal. Poster Congreso Nacional de Oftalmología Buenos Aires 2007.
15. Roberta P. A. Manzano, Gholam A. Peyman, Palwasha Khan, Petros E. Carvounis, Muhamet Kivilcim, Min Ren, Jonathan C Lake, Patricia Chevea Barrios: Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab(Avastin). *Br. J. Ophthalmol* 2007; 91:804-807.
16. Manzano R; Peyman G; Khan P et al. Inhibition of Experimental Corneal Neovascularization by Bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2006; 91 (6): 804-7.
17. Hurmeric V, Mumcouoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O, Durukan AH: Effect of subconjunctival bevacizumab (Avastin) on experimental corneal neovascularization in guinea pigs. *Cornea* 2008 Apr; 27(3): 357-62.
18. Felix Bock, Jasmine Onderka, Tina Dietrich, Björn Bachmann, Friedrich E. Kruse, Matthias Paschke, Grit Zahn, and Claus Cursiefen: Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, June 2007, Vol 48, No 6; 48:2545-2552.
19. Arenas E, Navarro M: Aplicación de corticosteroides intracorneanos de depósito en el tratamiento de rechazo de queratoplastia. *Archivos de la sociedad española de oftalmología* No 2 Febrero 2004.
20. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals . ARVO 1986. <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.html>
21. Ana Carolina Cabreira Vieira MD, Ana Luisa Höfling-Lima MD, Jose Alvaro Pereira Gomes MD, Denise Freitas MD, Micheil Eid Farah MD, Rubens Belfort Jr. MD: Intrastromal injection of Bevacizumab, in patients with corneal neovascularization-Brief report

22. Mario Saravia MD, Gustavo Zapata MD, Lourdes Racca MD, Alejandro Berra PhD: Inhibition of neovascularization with an anti- VEGF monoclonal antibody bevacizumab(Avastin) subconjunctival produce regression of inflammatory stromal damage in a rabbit model of herpetic stromal keratitis
23. Cursiefen C; Kruse FE. New Aspects of Angiogenesis in the Cornea. In: KRIEGLSTEIN GK; WEINREB RN. Essentials in Ophthalmology. Cornea and External Eye Disease. Cap 7.
24. Cursiefen C; Rummelt C; Kuchle M. Immunohistochemical Localization of Vascular Endothelial Growth Factor, Transforming Growth Factor α , and Transforming Growth Factor β_1 in Human Corneas with Neovascularization. Cornea 2000; 19(4): 526-533.
25. Cherry PMH; Garner A. Corneal Neovascularization treated with argon laser. Br J Ophthalmol 1976; 60: 464-472.
26. Miltiadis Papathanassiou, Panagiotis G. Theodossiadis, Vasilios S. Liarakos, Alexandros Rouvas, Evaggelos J. Giamarellos_Bourboulis, Ioannis A. Vergados: Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival Bevacizumab in an animal model. American Journal Ophthalmol 2008;145:424-431)
27. Carrasco MA: Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization in herpetic stromal keratitis. Cornea 2008 Jul; 27 (6): 743-5
28. Erdurmus M, Totan Y.: Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization . Graefes Arch. Clin Exp Ophthalmo 2007 Oct; 245 (10): 1557-9. Epub 2007 Apr.
29. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A: Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization. Cornea 2008 Feb; 27(2): 142-7
30. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A: Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization in recurrent pterygium. Curr Eye Res 2008 Jan; 33 (1): 23-8
31. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Vergados IA. Am J Ophthalmol 2008 Mar; 145 (3): 424-431.
32. Hosseini H, Nejabat M, Mehvar M, Yazdchi T, Sedaghat A, Noori F: Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. Clin Experiment Ophthalmol 2007 Nov; 35 (8): 745-8

33. Yoderuek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S, Bartz-Schmiedt KU, Szurman P: Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 2008 May; 86(3): 322-8.
34. Uv HS, Chan PS, Ang RE: Topical bevacizumab and ocular surface neovascularization in patients with stevens-johnson syndrome. *Cornea* 2008 Jan; 27(1): 70-3.
35. Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim TI: The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Ophthalmology* 2008 Jun; 115(6): e33-8.
36. Kenvon BM, Voest EE, Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ: A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996 Jul; 37(8): 1625-32.
37. Ma X, Ottino P, Bazan HE, Bazan NG: Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 Sep; 45(9): 2915-21.