

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS



UNIVERSITAS
Miguel
Hernández
TESIS DOCTORAL

**INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS CORNEAL MEDIANTE
INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA TÓPICOS
EN UN MODELO EXPERIMENTAL**

Realizada por

MARIA DOLORES LLEDÓ RIQUELME

2019





PROGRAMA DE DOCTORADO EN
SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

TESIS DOCTORAL

**INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS CORNEAL MEDIANTE
INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA TÓPICOS
EN UN MODELO EXPERIMENTAL**

Realizada por

MARIA DOLORES LLEDÓ RIQUELME

Director de la Tesis

PROF. DR. JORGE LUCIANO ALIÓ Y SANZ

2019

La presente Tesis Doctoral se presenta en **formato convencional** y como indicio de calidad de la misma se presenta junto con los méritos adjuntos en el ANEXO y el Artículo Original adjunto en el *Anexo 8.4 titulado:*

Lledó Riquelme M, Campos Mollo E, Fernández Sánchez L. Topical axitinib is a potent inhibitor of corneal neovascularization. Clin Exp Ophthalmol. 2018 Dec;46(9):1063-1074. doi: 10.1111/ceo.13333. Epub 2018 Jul 1. PMID: 29888852

Conflict of interest: None declared.

Funding sources: Publication of this article was supported in part by a research grant from the Institute of Health Carlos III (PS09/02407), Madrid, Spain.

Quartile: Q1

D. Jorge Luciano Alió y Sanz, director de la tesis doctoral “INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS CORNEAL MEDIANTE INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA TÓPICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL”

CERTIFICA:

Que Dña. María Dolores Lledó Riquelme ha realizado bajo mi supervisión su memoria de tesis doctoral titulada “INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS CORNEAL MEDIANTE INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA TÓPICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL” cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral en la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Lo que firmo en Sant Joan d’Alacant, a 31 de Julio de dos mil diecinueve.

Fdo. Dr. D. Jorge Luciano Alió y Sanz

Director de tesis

D. Félix Gutiérrez Rodero, Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

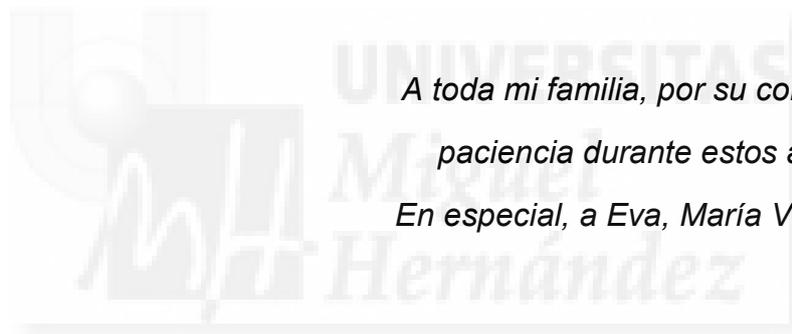
La presentación y defensa como tesis doctoral del trabajo “INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS CORNEAL MEDIANTE INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA TÓPICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL” realizado por Dña. María Dolores Lledó Riquelme bajo la dirección del Dr. D. Jorge Luciano Alió y Sanz. De acuerdo a la información recibida sobre las evaluaciones previas realizadas en cumplimiento de la normativa general vigente y la propia de la Universidad Miguel Hernández y según lo certificado por las personas que han realizado la tutoría y dirección, la tesis cumple los requisitos para proceder a su defensa pública.

En Sant Joan d’Alacant, a 31 de Julio de 2019

Firmado: Prof. Félix Gutiérrez Rodero

Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

*A toda mi familia, por su constante apoyo y
paciencia durante estos años de trabajo.
En especial, a Eva, María Victoria y Mariola*



*“Da tu primer paso ahora.
No importa que no veas el camino completo.
Sólo da el primer paso y el resto del camino
Irá apareciendo a medida que camines”.*

Martin Luther King Jr

FINANCIACIÓN / SUBVENCIÓN / BECA

BECA DEL FONDO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS (FIS)

Referencia: Expte: PS09/02407

Título del proyecto: “Inhibición de la angiogénesis corneal mediante inhibidores de la tirosina quinasa en un modelo experimental”.

Investigadores: Juan José Pérez Santonja., Ezequiel Campos Mollo, María Dolores Lledó Riquelme.

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III. Beca donada al Servicio de salud de Castilla La Mancha. Hospital Virgen del Perpetuo Socorro y trasladada a la Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana (FISABIO).

AYUDAS PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN MATERIA SANITARIA DE LA CONSELLERIA DE SANITAT

Referencia: AP-122/09

Título del proyecto: “Estudio de la inhibición de la angiogénesis corneal mediante inhibidores de la tirosina-quinasa tópicos”.

Investigadores: Juan José Pérez Santonja, Ezequiel Campos Mollo, María Dolores Lledó Riquelme.

Entidad financiadora: Conselleria de Sanitat. Beca donada al Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy.

INDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
LISTADO DE FIGURAS	5
LISTADO DE TABLAS	11
RESUMEN/ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. La córnea	17
1.1.1. Estructura de la córnea	17
1.1.2. Funciones de la córnea	21
1.1.3. Enfermedades neovasculares de la córnea	23
1.1.3.1. Infecciones oculares	26
1.1.3.2. Traumatismos oculares	27
1.1.3.3. Neoplasias, enfermedades degenerativas y enfermedades inflamatorias	28
1.1.3.4. Deficiencia de las células limbares	28
1.1.3.5. Hipoxia por lentes de contacto	28
1.1.3.6. Trasplante de córnea y neovascularización corneal	29
1.2. Angiogénesis corneal	29
1.2.1. Crecimiento vascular: vasculogénesis y angiogénesis	29
1.2.2. Sistema vascular limbar y neovascularización corneal	30
1.2.3. Etapas de la angiogénesis	32
1.2.3.1. El disparador del cambio angiogénico	33
1.2.3.2. Proceso de gemación de los vasos	33
1.2.3.3. Elongación del tallo vascular	36
1.2.3.4. Estabilización y maduración de los vasos recién formados	37
1.2.4. Avascularidad corneal: el privilegio corneal angiogénico y linfangogénico	39
1.3. Principios biológicos de la angiogénesis	41
1.3.1. Promotores de la angiogénesis corneal	41
1.3.2. Receptores tirosina quinasa de los factores de crecimiento	43
1.3.2.1. Estructura y función de los receptores tirosina quinasa	44
1.3.2.2. Activación del receptor: dimerización y fosforilación	46
1.3.2.3. Vías de señalización	48
1.3.3. Ligandos de los receptores tirosina quinasa	51
1.3.3.1. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	51
1.3.3.2. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	59

1.3.3.3. <i>El factor de crecimiento fibroblástico (FGF)</i>	63
1.3.2.4. <i>Las angiopoyetinas (Ang)</i>	65
1.4. Tratamiento de la neovascularización corneal	69
1.4.1. Tratamiento médico	69
1.4.2. Tratamiento quirúrgico	72
1.5. Inhibidores de la tirosina quinasa (ITQs) y los inhibidores de los receptores tirosina quinasa (IRTQs)	75
1.5.1. Selectividad y especificidad de los ITQs	76
1.5.2. Clasificación de los ITQs y mecanismos de acción	76
1.5.3. IRTQs en el tratamiento de las enfermedades sistémicas	80
1.5.4. IRTQs y el tratamiento de las enfermedades neovasculares del ojo	81
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	87
2.1. Justificación	87
2.2. Hipótesis	89
2.2.1. Hipótesis general	89
2.2.2. Hipótesis específicas	89
2.3. Objetivos	90
3. MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.1. Selección de los inhibidores de los receptores tirosina quinasa	91
3.1.1. Criterios de selección de los IRTQs	91
3.1.2. Vatalanib	91
3.1.3. Axitinib	94
3.1.4. Preparación de los IRTQs	96
3.2. Animales de experimentación y grupos de estudio	98
3.3. Anestesia	100
3.4. Determinación de las dimensiones del ojo de conejo	102
3.5. Técnica quirúrgica del modelo de NV corneal mediante patrón triangular de suturas	102
3.6. Determinación del área de estímulo (ACS)	105
3.7. Cuantificación de la superficie de NV corneal (SNVC)	105
3.8. Estudio de la morfología y la microdensidad vascular	106
3.8.1. Estudio de la morfología vascular	107
3.8.2. Estudio de la microdensidad vascular	109
3.9. Anatomía patológica	112
3.10. Evaluación de los efectos secundarios oculares	113
3.11. Análisis estadístico	113

4. RESULTADOS	115
4.1. Dimensiones básicas del ojo de conejo y áreas de estímulo angiogénico	115
4.2. Superficies de neovascularización corneal (SNVC)	116
4.2.1. Análisis de los grupos	116
4.2.2. Diferencias de crecimiento neovascular entre la primera y la segunda semana	125
4.2.3. Diferencias en la SNVC entre los grupos de vatalanib	127
4.2.4. Diferencias en la SNVC entre los grupos de axitinib	128
4.2.5. Diferencias entre vatalanib y axitinib de alta concentración	129
4.3. Estudio de la microdensidad vascular	129
4.3.1. Comparación del área de sección de los vasos	131
4.3.2. Comparación de la microdensidad vascular: número de vasos/mm ² y porcentaje de área vascular	133
4.4. Estudio de la morfología vascular	141
4.5. Anatomía patológica	148
4.6. Efectos secundarios oculares	153
5. DISCUSIÓN	155
5.1. Dimensiones básicas del ojo de conejo y del estímulo angiogénico	157
5.2. Estudio biomicroscópico: Inhibición de la superficie de neovascularización corneal	159
5.2.1. Grupo Control: Respuesta del modelo de NVC	159
5.2.2. Inhibición de la superficie de NVC por los IRTQs	159
5.2.2.1. Vatalanib	161
5.2.2.2. Axitinib	163
5.2.2.3. Diferencia entre los distintos fármacos antiangiogénicos	168
5.3. Estudio histológico: Disminución de la microdensidad vascular por los IRTQs	172
5.4. Estudio anatomopatológico: Angiogénesis e inflamación y cambios estructurales ..	174
5.5. Efectos secundarios de los IRTQs	176

5.6. Vía de administración de los IRTQs	179
5.7. El principal objetivo terapéutico: La prevención del rechazo del trasplante de córnea	182
5.8. Perspectivas terapéuticas y direcciones futuras	185
5.8.1. Nuevas técnicas de visualización de los vasos linfáticos	185
5.8.2. Profundización en el conocimiento de los mecanismos implicados en la angiogénesis	186
5.8.3. Diseño de nuevos inhibidores tirosina quinasa	187
5.8.4. Sistemas de liberación de los antiangiogénicos	189
5.8.5. Uso de los IRTQs en combinación con otros antiangiogénicos	190
5.8.6. Estudios futuros con vatalanib y axitinib	191
6. CONCLUSIONES	193
7. BIBLIOGRAFÍA	195
8. ANEXO: COMUNICACIONES DE INVESTIGACIÓN Y PUBLICACIONES	223
8.1. Premio	223
8.2. Comunicaciones de Investigación	223
8.3. Comunicaciones en Vídeo	224
8.4. Publicaciones autorreferenciadas	224
8.5. Artículo original	225
AGRADECIMIENTOS	247

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACS	Área cubierta por suturas.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo.
Ang	Angiopoyetina.
APC	<i>Antigen presenting-cell</i> . Células presentadoras de antígeno.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ASV	Área de sección de los vasos.
ATP	Adenosín trifosfato.
CEv	Célula endotelial vascular.
COX	Ciclooxigenasa.
D	Dioptría.
DALK	Deep anterior lamellar keratoplasty. Queratoplastia lamelar anterior profunda.
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad.
DMEK	<i>Descemet's membrane endothelial keratoplasty</i> . Queratoplastia endotelial de membrana de Descemet.
EBM	<i>Epithelial basement membrane</i> . Membrana basal epithelial.
EFNB2	<i>Ephrin-B2</i> . Efrina B2.
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> . Factor de crecimiento epidérmico.
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> . Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EPR	Epitelio pigmentario de la retina.
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> . Quinasa regulada por señal extracelular.
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> . Factor de crecimiento fibroblástico.
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i> . Receptor del factor de crecimiento fibroblástico.
Flk	<i>Fetal liver kinase</i> . Quinasa del hígado fetal.
Flt	<i>Fml-like tyrosine kinase</i> . Tirosina quinasa tipo Fml.
GAPs	<i>GTPase-activating proteins</i> . Proteínas activadoras de la GTPasa.
GDP	Guanosín difosfato.
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> . Factor de intercambio del nucleótido guanina.

GRB2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i> . Proteína ligadora del receptor del factor de crecimiento 2.
GTP	Guanosín trifosfato.
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i> . Factor inducible por hipoxia.
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i> . Antígeno leucocitario humano.
HS	Heparán sulfato.
HSPG	<i>Heparin sulfate proteoglycan</i> . Proteoglicano heparina sulfato.
HUVECs	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> . Células endoteliales de vena umbilical humana.
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i> . Molécula de adhesión intracelular.
IRTQ	Inhibidor del receptor tirosina quinasa.
Kb	Kilobase.
KDa	Kilodalton.
IL	Interleuquina
ITQ	Inhibidor tirosina quinasa
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> . Proteína quinasa activada por mitógeno.
MEK	<i>MAPK/ERK Kinase</i> . Quinasa MAPK/ERK.
µg	Microgramo.
µm	Micrómetro.
µM	Micromol.
mg	Miligramo.
ml	Mililitro.
mM	Milimol.
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> . Metaloproteinasa de la matriz.
MPEG-PCL	Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone). Metoxi poli(etilenglicol)-poli(caprolactona)
MT-MMP	<i>Membrane-type matrix metalloproteinase</i> . Metaloproteinasa de la matriz tipo membrana.
ng	Nanogramo.
nM	Nanomol.
Nrp	Neuropilina.
NV	Neovascularización.
NVC	Neovascularización corneal.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PAI	<i>Plasminogen activator inhibitor</i> . Inhibidor del activador del plasminógeno.

PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> . Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i> . Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
PEDF	<i>Pigment epithelium derived factor</i> . Factor derivado del epitelio pigmentario.
PG	Prostaglandina.
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> . Fosfatidilinositol quinasa-3.
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i> . Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato.
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphate</i> . Fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato.
PKB	<i>Phosphokinase B</i> . Fosfoquinasa B o Akt.
PKC	<i>Phosphokinase C</i> . Fosfoquinasa C.
PLC	<i>Phospholipase C</i> . Fosfolipasa C.
RTK	Receptor tirosina quinasa.
SNVC	Superficie de neovascularización corneal.
TFD	Terapia fotodinámica.
TGF	<i>Transforming growth factor</i> . Factor de crecimiento transformante.
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulins and EGF homologous domains</i> . Tirosina quinasa con dominios homólogos a las inmunoglobulinas y al EGF.
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i> . Inhibidor tisular de la metaloproteinasa.
tPA	Activador tisular del plasminógeno.
TNF	<i>Tumoral necrosis factor</i> . Factor de necrosis tumoral.
TSP	Trombospondina.
uPA	<i>Urokinase plasminogen activator</i> . Activador del plasminógeno uroquinasa.
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> . Factor de crecimiento endotelial vascular.
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> . Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.
VHS	Virus Herpes Simple.
VPF	<i>Vascular permeability factor</i> . Factor de permeabilidad vascular.

LISTADO DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1	La córnea	18
Figura 1.2.	Capas de la córnea.....	18
Figura 1.3.	La córnea constituye el dioptrio principal del ojo.....	22
Figura 1.4.	Enfermedades neovasculares de la córnea: a) Úlcera corneal herpética; b) queratitis bacteriana; c) rechazo de injerto corneal; d) queratopatía edematosa crónica	25
Figura 1.5	Vasculatura del segmento anterior del ojo	31
Figura 1.6.	Estructura de los capilares del limbo	32
Figura 1.7.	Degradación de la membrana basal vascular y desprendimiento de los pericitos.....	34
Figura 1.8.	Proceso de gemación de los vasos.....	35
Figura 1.9.	Tipos de células del brote vascular.....	36
Figura 1.10.	Migración de células endoteliales vasculares.....	37
Figura 1.11.	Proceso de estabilización y maduración del vaso.....	38
Figura 1.12.	Estructura del monómero del receptor tirosina quinasa	46
Figura 1.13.	Dimerización del receptor tirosina quinasa.....	47
Figura 1.14.	Vías de señalización de los receptores tirosina quinasa	48
Figura 1.15.	Exones codificantes de los aminoácidos de las distintas isoformas peptídicas generados por empalme alternativo (splicing).....	52
Figura 1.16	Estructura del VEGF humano.....	53
Figura 1.17.	Especificidades ligando-receptor y efectos biológicos de la activación del receptor.....	55
Figura 1.18.	Estructura de PDGF-BB humano.....	60
Figura 1.19.	Estructura del factor de crecimiento fibroblástico ácido humano.....	63
Figura 1.20.	Estructura de la angiopoyetina-1	66
Figura 1.21.	Funciones de Ang-1 y Ang-2.....	68
Figura 1.22.	Unión de bevacizumab a dos moléculas de VEGF.....	71

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 3.1.	Estructura de vatalanib (PTK/ZK).....	93
Figura 3.2.	Estructura de axitinib (AG-013736).....	94
Figura 3.3.	Axitinib interactuando con el dominio quinasa del receptor VEGFR-2.	95
Figura 3.4.	Cronología de los procedimientos.....	100
Figura 3.5.	Marcado de la córnea con marcador de queratotomía radial.....	103
Figura 3.6.	Modelo de NVC mediante patrón triangular de suturas con base en limbo.....	104
Figura 3.7	Resultado del modelo de NVC después de la intervención quirúrgica.	104
Figura 3.8.	Medición de área de estímulo representado por el área cubierta por suturas (ACS).....	105
Figura 3.9.	Preparación de las piezas histológicas para el estudio de microdensidad vascular.....	107
Figura 3.10.	Izquierda: cámara lúcida adaptada a microscopio óptico; Derecha: superposición de la imagen del microscopio con la imagen del papel donde se van a dibujar los neovasos generada por la cámara lúcida.	108
Figura 3.11.	Áreas de superficie vascular dibujadas mediante cámara lúcida.....	108
Figura 3.12.	Zonas de estudio de la microdensidad vascular.....	109
Figura 3.13.	Estudio de la microdensidad vascular y análisis de la sección de los vasos.....	110

4. RESULTADOS

Figura 4.1.	Superficies medias de neovascularización corneal en el día 7 medidas en las fotografías biomicroscópicas y expresadas en porcentaje (Media \pm DS) respecto al ACS.....	117
Figura 4.2.	Superficies medias de neovascularización corneal en el día 14 medidas en las fotografías biomicroscópicas y expresadas en porcentaje (Media \pm DS) respecto al ACS.....	118
Figura 4.3.	Medición de la SNVC en fotografía calibrada a color (izquierda) y ane-ritra (derecha) en el día 7 después de iniciar el tratamiento en el grupo de suero fisiológico.....	119
Figura 4.4.	Medición de la SNVC en fotografía calibrada a color (izquierda) y ane-ritra (derecha) en el día 14 después de iniciar el tratamiento en el grupo de suero fisiológico.....	119
Figura 4.5.	Medición de la SNVC en el día 7 después del tratamiento con vatalanib 0,4 mg/ml.....	120

Figura 4.6.	Medición de la SNVC en el día 14. Inhibición de la neovascularización después de la administración de vatalanib 0,4 mg/ml.....	120
Figura 4.7.	Medición de la SNVC en el día 7 después del tratamiento con vatalanib 3,5 mg/ml.....	121
Figura 4.8.	Medición de la SNVC en el día 14 en el grupo del vatalanib 3,5 mg/ml. La neovascularización corneal es anterior a la primera hilera de suturas.....	121
Figura 4.9.	Medición en el día 7 después del tratamiento con axitinib 0,02 mg/ml. La neovascularización supera la primera hilera de suturas.....	122
Figura 4.10.	Medición en el día 14 después del tratamiento con axitinib 0,02mg/ml. La neovascularización se extiende alcanzando la segunda hilera de suturas.....	120
Figura 4.11.	Medición de la SNVC en el día 7 después del tratamiento con axitinib 0,35 mg/ml.....	122
Figura 4.12.	Medición de la SNVC en el día 14 después del tratamiento con axitinib 0,35 mg/ml.....	123
Figura 4.13.	Medición de la SNVC en el día 7 después del tratamiento con axitinib 0,5 mg/ml.....	124
Figura 4.14.	Medición de la SNVC en el día 14 después del tratamiento con axitinib 0,5 mg/ml.....	124
Figura 4.15.	Proporción área vascularizada/área avascular respecto al área de estímulo representada por el ACS para cada uno de los grupos.....	125
Figura 4.16.	Crecimiento semanal medio de los neovasos durante la primera y la segunda semana (Media \pm DS; test de Student para muestras relacionadas) expresada en mm ²	127
Figura 4.17.	Esquema representativo del área de la sección de los vasos.....	132
Figura 4.18.	Promedio de las áreas medias de la sección los vasos para todos los grupos a los 14 días de tratamiento en la zona 1.....	133
Figura 4.19.	Promedio de las medianas de la sección los vasos para todos los grupos a los 14 días de tratamiento en la zona 1.....	133
Figura 4.20.	Gráfica que muestra para cada grupo el promedio de la microdensidad vascular expresada en nº de vasos/mm ² de la zona próxima al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2).....	135
Figura 4.21.	Gráfica que muestra para cada grupo el promedio de la microdensidad vascular expresada en porcentaje del área vascular respecto al estroma corneal seccionado de la zona próxima al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2).....	136

Figura 4.22.	Suero fisiológico. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha) teñida mediante la técnica de la NADPH diaforasa (X 100).....	137
Figura 4.23.	Vatalanib 0,4 mg/ml. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).....	137
Figura 4.24.	Vatalanib 3,5 mg/ml. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).....	138
Figura 4.25.	Axitinib 0,02. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).....	139
Figura 4.26.	Axitinib 0,35 mg/ml. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).....	139
Figura 4.27.	Axitinib 0,5 mg/ml. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).....	140
Figura 4.28.	Imagen de la superficie de neovascularización corneal del grupo de suero fisiológico de una muestra tratada mediante tinción enzimática. Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).....	143
Figura 4.29.	Estructuras vasculares con aspecto arborescente en los ojos tratados con IRTQs. Vatalanib (superior izquierda); Axitinib (superior-derecha e inferior). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).....	144
Figura 4.30.	Cambios de la morfología vascular en córneas tratadas con axitinib.	144
Figura 4.31.	Suero fisiológico (cámara lúcida).....	145
Figura 4.32.	Vatalanib 0,4 mg/ml (cámara lúcida).....	145
Figura 4.33.	Vatalanib 3,5 mg/ml (cámara lúcida).....	146
Figura 4.34.	Axitinib 0,02 mg/ml (cámara lúcida).....	146
Figura 4.35.	Axitinib 0,35 mg/ml (camara lúcida).....	147
Figura 4.36.	Axitinib 0,5 mg/ml (cámara lúcida).....	147
Figura 4.37.	Sección de la córnea de conejo a nivel de la salida del punto de sutura. (H&E x 100).....	148
Figura 4.38.	El granuloma por reacción a cuerpo extraño está constituido por macrófagos, células epiteloides, células gigantes multinucleadas y un infiltrado linfoplasmocitario. (H&E x 100).....	149
Figura 4.39.	Células gigantes multinucleadas. (H&E x 400).....	150
Figura 4.40.	Izquierda: Sección longitudinal de un vaso que discurre paralelamente a las fibras de colágeno (H&E x 100); Derecha: Sección transversal de los vasos con presencia de glóbulos rojos en su interior (H&E x 400)....	151
Figura 4.41.	Corte histológico a nivel del punto de sutura distal en un conejo tratado con vatalanib donde la neovascularización está inhibida. (H&E x 40)....	152
Figura 4.42.	Izquierda: mínima reacción inflamatoria en un punto proximal de una córnea de conejo tratada con axitinib. Granuloma pequeño y bien delimitado alrededor de los puntos de sutura (H&E x 100); Derecha:	153

	<i>Punto de sutura distal sin infiltración inflamatoria en la córnea de un conejo tratada con axitinib (H&E x 200).....</i>	
Figura 4.43.	<i>Coloración de los inhibidores de los receptores tirosina diluidos en suero fisiológico en la presente tesis doctoral. Izquierda: vatalanib; derecha: axitinib.....</i>	154
Figura 4.44.	<i>Izquierda: color amarillo dorado de sunitinib diluido en suero fisiológico (0,5 mg/ml); derecha: tinción amarillenta en el cuadrante anterior e inferior del iris.....</i>	154
5. DISCUSIÓN		
Figura 5.1.	<i>Diferencias de la potencia de los receptores tirosina quinasa estudiados con relación al porcentaje de inhibición de la superficie de NVC respecto al grupo control medida en mm².....</i>	170



LISTADO DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1.	Medidas de la córnea y sus propiedades ópticas.....	17
Tabla 1.2.	Enfermedades asociadas a neovascularización corneal.....	26
Tabla 1.3.	Mecanismos biológicos que contribuyen al privilegio corneal angiogénico y linfangiogénico.....	40
Tabla 1.4.	Factores que promueven la angiogénesis.....	43
Tabla 1.5	Miembros de la familia del VEGF y sus funciones; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular; Nrp: Neuropilina.....	52
Tabla 1.6	Resumen de las funciones del VEGF en las células endoteliales.....	57
Tabla 1.7.	Comparación entre diferentes tipos de inhibidores tirosina quinasa....	79
Tabla 1.8.	Inhibidores de receptores tirosina quinasa aprobados por la FDA (US Food & Drug Administration)	80
Tabla 1.9.	Inhibidores de receptores tirosina quinasa estudiados en el campo de la oftalmología.....	81

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3.1.	Inhibición celular de la autofosforilación del receptor por vatalanib.....	94
Tabla 3.2.	Inhibición celular de la autofosforilación del receptor por axitinib.....	96
Tabla 3.3.	Concentraciones tópicas de los fármacos equiparables a bevacizumab.....	97
Tabla 3.4.	Concentraciones tópicas de los fármacos equiparables a sunitinib.....	97
Tabla 3.5.	Distribución de los grupos experimentales.....	99
Tabla 3.6.	Análisis cuantitativo de los vasos y la microvascularidad.....	111
Tabla 3.7.	Pasos para la tinción de H&E.....	112

4. RESULTADOS

Tabla 4.1.	<i>Dimensiones medias básicas del ojo de conejo.....</i>	116
Tabla 4.2	<i>Superficies medias de neovascularización corneal mediante lámpara de hendidura en el día 7 (Media ± DS) en términos de mm² y en porcentaje respecto al ACS y a la superficie total de la córnea. Relación de inhibición de la SNVC expresada en mm² respecto al grupo control.....</i>	117
Tabla 4.3.	<i>Superficies medias de neovascularización corneal mediante lámpara de hendidura en el día 14 (Media ± DS) en términos de mm² y en porcentaje respecto al ACS y a la superficie total de la córnea. Relación de inhibición de la SNVC expresada en mm² respecto al grupo control.....</i>	118
Tabla 4.4.	<i>Crecimiento semanal medio de los neovasos durante la primera y la segunda semana (Media ± DS; test de Student para muestras relacionadas) en mm² y en porcentaje respecto al ACS; relación del crecimiento respecto a la primera semana medido en mm².....</i>	126
Tabla 4.5.	<i>Dimensiones básicas de todos los neovasos seccionados para todos los grupos a los 14 días de tratamiento (incluye zona 1 y 2).....</i>	130
Tabla 4.6	<i>Comparación de las áreas medias de la sección de los vasos para todos los grupos a los 14 días de tratamiento en la Zona 1.....</i>	132
Tabla 4.7.	<i>Comparación de las medianas de la sección de los vasos para todos los grupos a los 14 días de tratamiento en la Zona 1.....</i>	132
Tabla 4.8.	<i>Datos de la microdensidad vascular expresada en número de vasos/mm² de la zona próxima al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2) para todos los grupos.....</i>	134
Tabla 4.9.	<i>Datos de la microdensidad vascular expresada en % del área vascular respecto al área de estroma seccionado de la zona próxima al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2) para todos los grupos.....</i>	134

5. DISCUSIÓN

RESUMEN / ABSTRACT

RESUMEN

Introducción

La neovascularización corneal (NVC) es una consecuencia común de varias enfermedades corneales inflamatorias, infecciosas y traumáticas. Además, la neovascularización corneal permite el acceso de células inmunes circulantes, lo que reduce el privilegio inmune de la córnea y, posteriormente, compromete la supervivencia de los injertos en el trasplante corneal. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se considera el factor angiogénico más importante. Los inhibidores de los receptores tirosina quinasa (IRTQ) son una familia de pequeñas moléculas que inhiben intensamente la actividad de los receptores tirosina quinasa de diferentes factores de crecimiento, incluidos el VEGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estas moléculas se han establecido como fármacos clínicamente útiles para el tratamiento del cáncer. Vatalanib es un IRTQ con función biológica específica contra los receptores de VEGF (VEGFR-1 y VEGFR 2) y el receptor de PDGF (PDGFR). Axitinib es una molécula de pequeño tamaño, potente inhibidor selectivo de los receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) y también bloquea los receptores de PDGF.

Objetivo

El propósito del presente estudio es investigar la capacidad antiangiogénica de vatalanib y axitinib administrados tópicamente en un modelo de NVC inducido por suturas en el ojo de conejo a diferentes concentraciones: a) vatalanib (0,4 mg/ml); b) vatalanib (3,5 mg/ml); c) axitinib (0,02 mg/ml); d) axitinib (0,35 mg/ml) y e) axitinib (0,5 mg/ml).

Métodos

Se creó un modelo NVC en el ojo derecho de cada conejo basado en la colocación de cinco puntos de suturas de seda virgen azul interrumpida 8/0 en la

córnea superior siguiendo un patrón triangular con base en el limbo. Al día siguiente, se administraron dos gotas del agente seleccionado por vía tópica tres veces al día durante 2 semanas. Se realizó un control fotográfico con lámpara de hendidura para cuantificar la superficie de neovascularización corneal los días 7 y 14. Los conejos fueron sacrificados después de 2 semanas, y las córneas fueron procesadas mediante tinción enzimática para analizar la microdensidad vascular. Se seleccionaron ocho ojos para analizar la morfología vascular y cuatro ojos para el estudio anatomopatológico.

Resultados

Después de 14 días de tratamiento tópico con vatalanib y axitinib a diferentes concentraciones, se observó una inhibición significativa de la SNVC en comparación con el grupo control. La respuesta inhibitoria de cada fármaco a altas concentraciones fue mayor que las concentraciones más bajas. A alta concentración, vatalanib (3,5 mg/ml) inhibió de forma significativa la SNVC en un 62,20 % y axitinib (0,5 mg/ml) en un 84,74%. Nuestros resultados experimentales mostraron que axitinib tópico (0,5 mg/ml) fue significativamente más efectivo que vatalanib (3,5 mg / ml) en términos de inhibición de la SNVC, y esta inhibición fue 1,6 veces más potente.

En comparación con el grupo control, las secciones corneales histológicas de los inhibidores tirosina quinasa generalmente mostraron una inflamación más baja. Vatalanib y axitinib, a las dosis y duración utilizadas en el estudio, fueron seguros y bien tolerados.

Conclusión

En resumen, los inhibidores de los receptores tirosina quinasa administrados tópicamente, vatalanib y axitinib, inhibieron la NVC de forma significativa en el ojo de conejo. La alta capacidad de axitinib para bloquear la neovascularización en la córnea podría ser consecuencia de su actividad multidiana, inhibiendo tanto el VEGF como el PDGF. Los inhibidores tirosina quinasa mediante administración tópica, son un concepto terapéutico emergente que ofrece tratamientos prometedores para las enfermedades oculares neovasculares, tanto corneales como intra-oculares, y estos resultados necesitarán investigaciones clínicas en humanos.

ABSTRACT

Introduction

Corneal neovascularization (CNV) is a common consequence of several inflammatory, infectious and traumatic corneal diseases. In addition, neovascularization introduces circulating immune cells, reducing the immune privilege of the cornea and subsequently compromising the survival of corneal transplant grafts. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is commonly considered the most prominent angiogenic factor. Tyrosine kinase inhibitors (TKI) are a family of small molecules that strongly inhibits the kinase activity against receptors for different growth factors including vascular VEGF and platelet-derived growth factor (PDGF). These molecules have been well established as clinically useful drugs for the treatment of cancer. Vatalanib is a TKI with specific biological function against VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR 2) and PDGF receptor, and axitinib is a potent small selective inhibitor of all VEGF receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) and also blocks PDGF receptor.

Objective

The purpose of the present study is to investigate the antiangiogenic capacity of topically administered vatalanib and axitinib in a rabbit suture-induced CNV model at different concentrations: a) vatalanib (0.4 mg/ml); b) vatalanib (3.5 mg/ml); c) axitinib (0.02 mg/ml); d) axitinib (0.35 mg/ml) and e) axitinib (0,5 mg/ml).

Methods

A CNV model was induced in the right eye of each rabbit based on the placement of five 8/0 interrupted blue virgin silk sutures suture in the upper cornea following a limbal-based triangular pattern. Beginning the following day, two drops of the selected agent were topically administered three times a day for 2 weeks. Slit-lamp photographic control was performed to quantify the corneal neovascularization surface (CNVS) on days 7 and 14. The rabbits were sacrificed after 2 weeks, and the corneas were processed by enzymatic staining to analyse the vascular

microdensity. Eight eyes were designated to analyse vascular morphology, and four eyes for the anatomopathological study.

Results

After 14 days of topical treatment with vatalanib and axitinib at different concentrations, significant inhibition of CNV was observed compared with the control group. The inhibitory response induced at high concentrations of each drug was greater than lower concentrations inhibiting neovascularization. At high concentration, vatalanib (3.5 mg/ml) inhibited the CNVS by 62.20%% and axitinib (0.5 mg/ml) caused significant and intense inhibition by 84,74%. Our experimental results showed that topical axitinib (0.5mg/ml) was significantly more effective than vatalanib (3.5 mg/ml) in terms of inhibition of CNVS, and this inhibition was 1.6 times more profound.

Compared with the control group, histological corneal sections of the TKI generally showed lower inflammation. Vatalanib and axitinib, at the doses and duration used in the study, were safe and well tolerated.

Conclusion

In summary, topically administered, tyrosine kinase receptor inhibitors, vatalanib and axitinib, inhibited CNV in rabbit eyes. The high capacity of axitinib to block neovascularization in the cornea could be a consequence of its multitargeting activity, inhibiting both VEGF and PDGF. TKI, by topical administration are an emerging therapeutic concept that offers promising treatments for neovascular eye diseases, both corneal and intraocular, and these results mandate further clinical investigation in humans.

1.

INTRODUCCIÓN

1.1. LA CÓRNEA

La córnea es un tejido denso, elástico, transparente y avascular del ojo que se encuentra expuesto al medio externo. Constituye más de dos tercios del poder refractivo del ojo y su principal requerimiento fisiológico es mantener la transparencia para conseguir una visión óptima (Figura 1.1.). Las alteraciones que afectan a la superficie de la córnea o a su espesor total pueden resultar en una alteración de la refracción grave [1].

1.1.1. Estructura de la córnea

Las medidas físicas de la córnea y sus propiedades ópticas se describen en la Tabla 1.1 [2-4]:

Diámetro	11,7 mm (horizontal) 10,6 mm (vertical)
Espesor central	535 micras
Radio de curvatura anterior	7,8 mm
Radio de curvatura posterior	6,2 - 6,8 mm
Poder refractivo de la superficie anterior	48,83 dioptrías
Poder refractivo de la superficie posterior	-5,88 dioptrías
Poder refractivo total	43,05 dioptrías
Índice de refracción	1,376
Contenido en agua	78%
Contenido en colágeno	15%
Contenido de otras proteínas	5%

Tabla 1.1. Medidas de la córnea y sus propiedades ópticas.



Figura 1.1. La córnea: es la porción anterior del segmento anterior del ojo que se asemeja la esfera de un reloj. Sus propiedades fundamentales son la transparencia y avascularidad.

En la periferia, la córnea limita con la esclera mediante una zona de transición denominada **limbo corneal**. Estructuralmente, desde la superficie anterior a la posterior, la córnea se divide en 6 capas (Figura 1.2): epitelio, membrana de Bowman, estroma, capa predescemética, membrana de Descemet y endotelio.

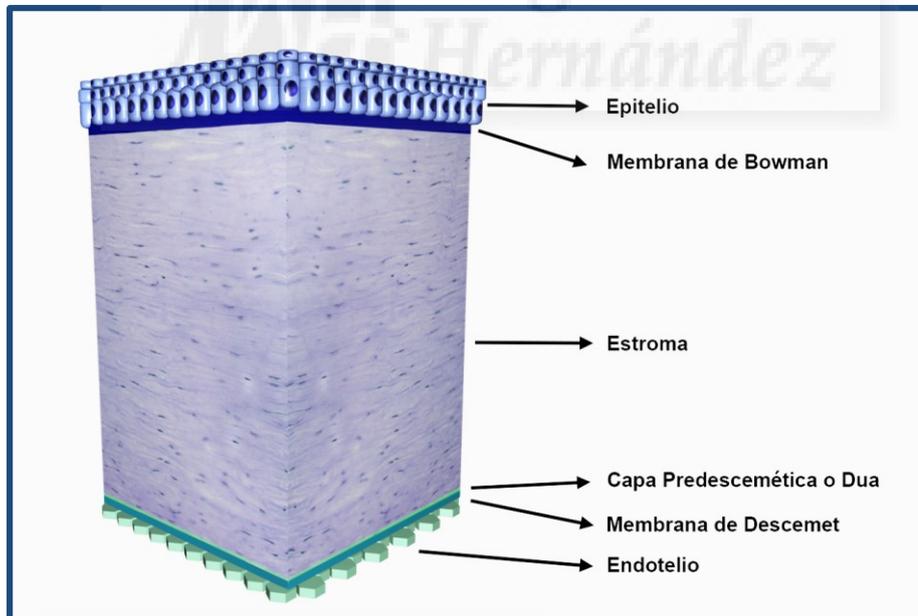


Figura 1.2. Capas de la córnea.

Epitelio corneal

El epitelio de la córnea está formado por 5-7 capas de células de epitelio escamoso estratificado alcanzando un grosor total de 50-56 micras. En la capa más interna, las células basales tienen una forma columnar y se disponen muy juntas, estrechamente adheridas a su membrana basal que las separa de la membrana de Bowman. En las capas medias, las células adquieren una forma alada o de paraguas [5]. Por último, en la superficie, el epitelio es escamoso y las células se disponen de forma superpuesta. [6].

El epitelio de la córnea se renueva a partir de las células primordiales o células madres (*stem cell*) que se localizan en el epitelio basal del limbo corneal [7, 8].

El epitelio de la está constituido por un complejo intracelular denso que lo hace resistente a las presiones de abrasión. Se han descrito diversas moléculas implicadas en la adherencia intercelular como las cadherinas e integrinas. Además, las células basales están unidas entre sí mediante microestructuras complejas que juegan un papel fundamental en la comunicación intercelular y en la formación de barreras como los desmosomas, las uniones estrechas (*tight junctions*) y las uniones comunicantes (*gap junctions*) [6].

Membrana de Bowman

La membrana de Bowman es una capa de tejido liso acelular de 8-12 μm de espesor que solo ha sido hallada en primates. Se trata de un tejido no regenerativo acelular que está constituido por fibras de colágeno tipo IV distribuidas de forma uniforme [6].

La función de esta membrana no es del todo conocida, aunque se postula que este tejido actuaría como una barrera física de protección del plexo nervioso subepitelial para acelerar la inervación del epitelio corneal y la recuperación sensorial tras una lesión. Por otro lado, también funcionaría como una barrera para evitar que un traumatismo contacte directamente con el estroma, considerándose, de este modo, un factor importante en la cicatrización y restauración estromal [9]. No obstante, en la técnica quirúrgica denominada queratectomía fotorrefractiva (PRK) que se utiliza para el tratamiento con láser de algunos defectos refractivos,

se ablaciona parte de la membrana de Bowman y la transparencia corneal no se ve afectada [6].

Estroma corneal

El estroma corneal o tiene un grosor de unos 500 μm constituyendo el 90% de todo el espesor corneal. Está formado por fibras de colágeno (fundamentalmente de tipo I y V), queratocitos y matriz extracelular. El estrecho diámetro existente entre las fibras (30-38 μm) y la disposición de las mismas aseguran una tensión uniforme que contribuye a la transparencia y la resistencia de la córnea [6].

Capa predescemética o capa Dua

Recientemente se ha hallado una fuerte capa acelular y bien definida en la córnea predescemética. Los estudios de histopatología han mostrado que se trata de una capa sin queratocitos de $10,15 \pm 3,6 \mu\text{m}$ de espesor y formada por 5 a 8 lamelas finas de colágeno tipo I altamente empaquetadas y dispuestas en dirección longitudinal, transversa y oblicua [10].

Membrana de Descemet

La membrana basal del endotelio corneal (membrana de Descemet) está constituida por una capa fina y homogénea de 2-20 μm de grosor que se une de forma tenue al estroma. Está compuesta fundamentalmente por glicoproteínas, laminina y colágeno IV, confiriendo una resistencia y elasticidad mayor que el estroma corneal ante lesiones traumáticas o inflamatorias [11].

Endotelio corneal

El endotelio corneal es una monocapa de células cuboides que forman un mosaico hexagonal de unas 5 μm de espesor. Las células, en su porción apical, se encuentran en contacto con el humor acuoso y presentan una superficie lisa con buenas condiciones ópticas. La función principal del endotelio de la córnea es la regulación del fluido que penetra en la córnea desde la cámara anterior del ojo. Las células endoteliales no se reproducen y se va perdiendo la densidad celular a

lo largo de los años. Cuando una célula endotelial muere, las células vecinas cambian su tamaño (polimegatismo) y modifican su forma (pleomorfismo) para rellenar el espacio que ocupaba antes. Aproximadamente, el número células endoteliales necesario para conservar la transparencia de la córnea es de 700-1000 células/mm² [3].

Inervación de la córnea

La córnea es una de las estructuras más inervadas del organismo y esta sensibilidad es fundamental para su protección. Los nervios sensitivos, derivados de los nervios ciliares (ramas terminales de la división oftálmica del V par craneal) penetran en la córnea a través de las capas estromales media y anterior, y se dirigen radialmente hacia la zona central y las capas superficiales de la córnea.

Las fibras nerviosas, una vez han penetrado 1 mm o más en la córnea, pierden su vaina de mielina. Posteriormente, se dividen y atraviesan la membrana de Bowman generando un plexo nervioso debajo del epitelio y las terminaciones nerviosas libres de dicho plexo se disponen entre las células epiteliales. Cuando se lesionan las terminaciones nerviosas ya no se alcanza la misma sensibilidad después de la regeneración del epitelio corneal [12].

1.1.2. Funciones de la córnea.

Metabolismo corneal

La córnea es avascular, por tanto, el oxígeno lo recibe de forma directa desde la atmósfera. Por otro lado, el epitelio corneal protege al ojo de numerosos agentes patógenos, limitando la entrada de fluidos al ojo desde la superficie ocular. Para su mantenimiento, es fundamental un epitelio íntegro caracterizado por la capacidad del epitelio para renovarse y responder ante una agresión.

La córnea está constituida por un 78% de agua. El desplazamiento de flujo de agua y otras sustancias desde el humor acuoso de la cámara anterior hacia el estroma corneal está regulado por la barrera de células endeliales manteniendo la transparencia y el espesor del tejido corneal. Se trata de una función esencial que se altera cuando se pierde la integridad de la monocapa de células endoteliales. El transporte de agua hacia el humor acuoso es el resultado resulta del flujo de

iones de sodio y bicarbonato a través de la capa celular endotelial mediante el bombeo que genera la enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ [6].

Transparencia corneal y el poder refractivo de la córnea

Las características anatomofisiológicas descritas son responsables de la transparencia corneal que permite una capacidad refractiva precisa. Así pues, podríamos afirmar que la córnea se comporta como una ventana y una lente respectivamente.

La córnea posee una enorme capacidad refractiva constituyendo el dioptrio principal del ojo. Para llevar a cabo esta función, además de su transparencia, la córnea debe conservar unas superficies refractivas lisas y regulares. La integridad física de su estructura y la función del epitelio corneal y del endotelio mantienen esta delicada propiedad. Las características biomecánicas, bioquímicas y fisiológicas de la córnea junto con las propiedades ópticas son las que determinan su poder dióptrico [6] (Figura 1.3).

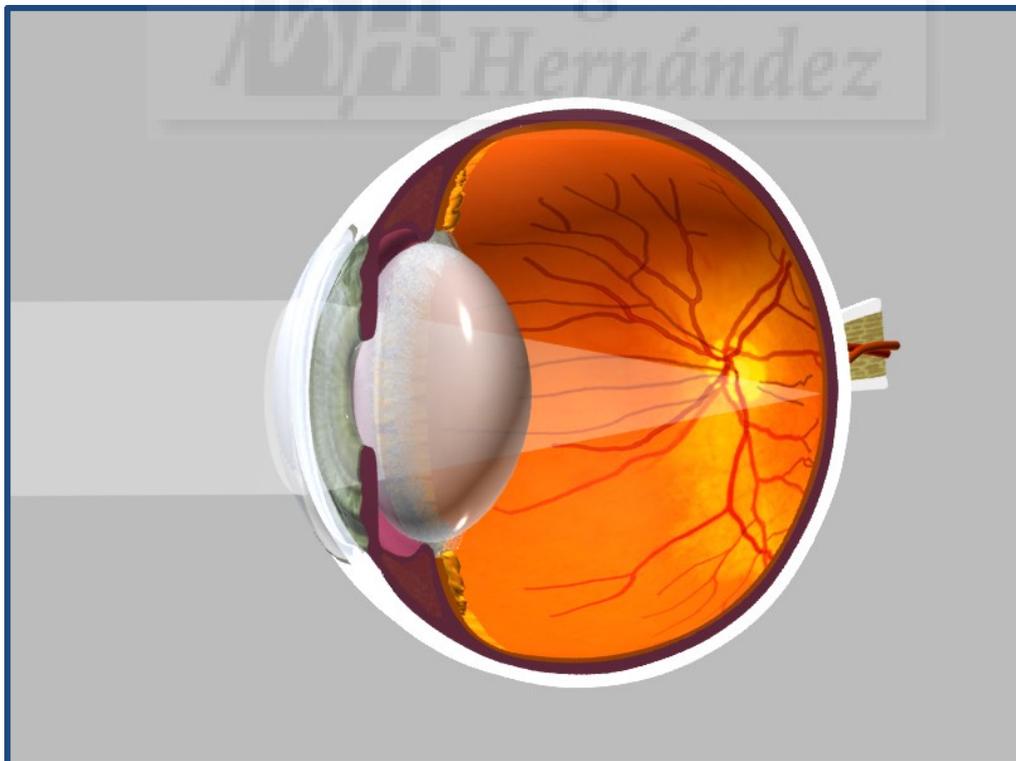


Figura 1.3. La córnea constituye el dioptrio principal del ojo

Respuesta corneal ante una agresión

La córnea es susceptible de sufrir lesiones tanto de forma natural (infecciones, traumatismos etc.) como iatrogénica (lentes de contacto, láser, procedimientos quirúrgicos, etc.).

El epitelio de la córnea se renueva cada 7 días pero, ante un traumatismo, se inicia una respuesta que se divide en tres etapas diferentes: a) fase latente (etapa de 46 horas), en la que se eliminan restos celulares, las células cambian morfológicamente para hacerse más redondas y se reducen las uniones celulares (hemidesmosomas) en las zonas lesionadas [13]; b) fase de migración celular (de 24-36 horas), en la que se incrementa la velocidad de motilidad ocular para cubrir la pérdida de sustancia en el menor tiempo posible y se recupera el efecto barrera [14], y c) fase de proliferación celular, en la que las células primordiales del limbo se activan, se generan los complejos de unión con la membrana de Bowman y se establecen de nuevo las terminaciones nerviosas [6].

1.1.3. Enfermedades neovasculares de la córnea

La avascularidad, el mínimo espesor corneal y la disposición ordenada de las fibras colágenas del estroma explican que la luz se transmita de forma adecuada. Sin embargo, en condiciones patológicas pueden crecer nuevos vasos sanguíneos en su interior. Aunque el crecimiento de neovasos, en ocasiones, podría tener un rol beneficioso contra la infección, la curación de las heridas y detención de la disolución estromal (*melting*), sus desventajas son numerosas y a menudo producen tejido cicatricial, edema y la persistencia de una inflamación que puede alterar la visión [15, 16].

La **neovascularización corneal (NVC)** está presente aproximadamente en el 4% de los pacientes que acuden a la clínica oftalmológica y en el 12% de estos casos se asocia con pérdida de agudeza visual [17]. La NVC es un problema que no sólo reduce la visión, sino que también da lugar a la pérdida del privilegio inmune de la córnea empeorando el pronóstico de aquellas enfermedades corneales que requieren un trasplante de córnea (queratoplastia) incrementando el fracaso del injerto corneal y el rechazo del trasplante [18, 19].

La NVC ocurre como una respuesta inespecífica a gran variedad de problemas clínicos como la infección, cirugía refractiva, enfermedad autoinmune, deficiencia de células limbares, distrofia y uso de lentes de contacto. (Figura 1.4) (Tabla 1.2) [15, 20].

La angiogénesis corneal produce un deterioro de la visión grave comprometiendo la transparencia corneal y alterando sus propiedades ópticas a causa de: a) la opacidad producida por la circulación de células sanguíneas en los canales vasculares; b) arquitectura irregular de las paredes vasculares que induce aberraciones de alto orden; c) alteraciones en el área del colágeno estromal adyacente a los vasos sanguíneos; d) edema y depósitos lipídicos en los tejidos que rodean dichos vasos; y e) irregularidad de la superficie corneal en casos de pannus superficial [15].

Muchas infecciones pueden causar NVC con patrones de respuesta diferentes. El patrón clínico de invasión vascular (vascularización estromal superficial o profunda) es a menudo indicativo de la etiología de la neovascularización corneal. La **vascularización estromal profunda** generalmente se desarrolla en respuesta a una queratitis intersticial (como por ejemplo la queratitis estromal herpética) o secundariamente a un trauma ocular significativo. Se puede observar en cualquier nivel del estroma como vasos que se ramifican ocasionalmente acompañados de depósitos lipídicos que se manifiestan como opacidades blanco-amariillentas [21].

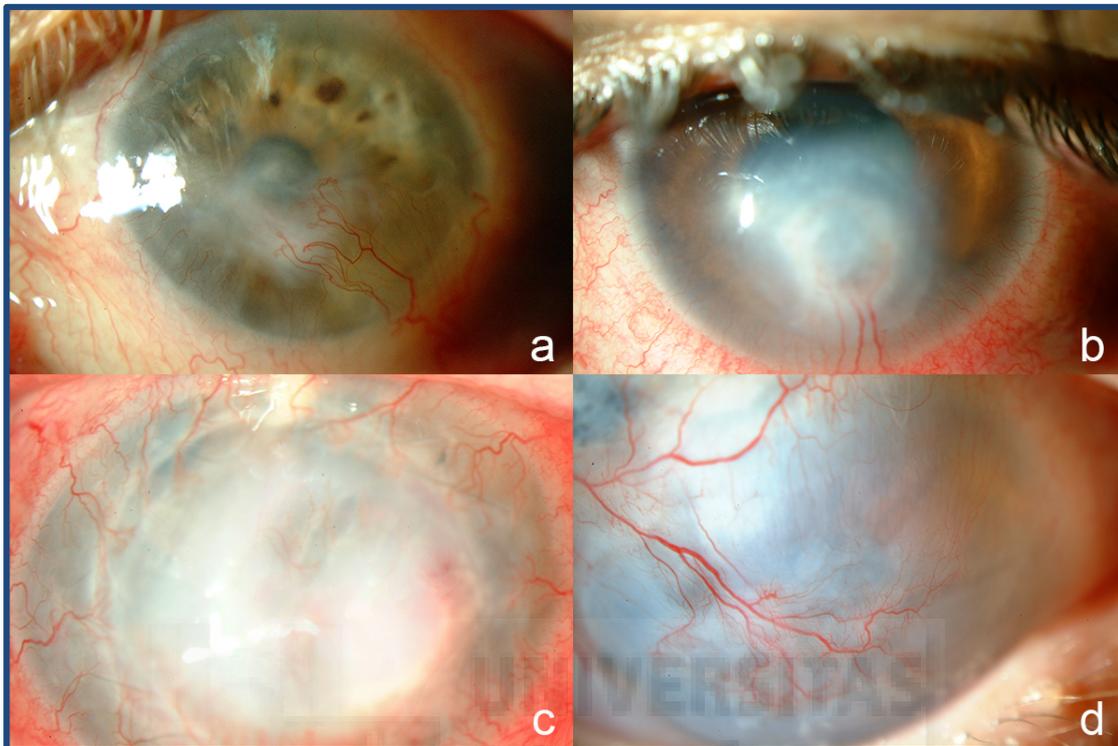


Figura 1.4. Enfermedades neovasculares de la córnea: a) Úlcera corneal herpética; b) queratitis bacteriana; c) rechazo de injerto corneal; d) queratopatía edematosa crónica.

Sin embargo, cuando la neovascularización es resultado de una irritación superficial y crónica de la córnea, detectada frecuentemente en pacientes con lentes de contacto, cirugías previas y quemaduras químicas, los neovasos se desarrollan desde la arcada marginal extendiéndose debajo del epitelio a través del estroma superficial [15, 17]. Este crecimiento más allá de la arcada límbica normal se denomina **pannus** y se puede acompañar de tejido fibroso subepitelial o de cicatrización del estroma disminuyendo la transparencia corneal [22].

ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LA NVC

Enfermedades infecciosas

Virales

Herpes simple, herpes zoster

Bacterianas

Pseudomona, *Chlamydia trachomatis*, Sífilis

Fúngicas

Cándida, Fusarium, Aspergillus

Parasitarias

Oncocercosis

Enfermedades inflamatorias

Penfigoide ocular

Conjuntivitis atópica

Rosácea

Rechazo de injerto corneal

Síndrome de Lyell

Síndrome de Stevens-Johnson

Enfermedad de injerto contra el huésped

Enfermedades degenerativas-congénitas

Pterigium

Degeneración marginal de Terrien

Aniridia

Enfermedades Traumáticas/yatrogénicas y misceláneas

Deficiencia de células madre

Lentes de contacto

Quemaduras por álcalis

Ulceración

Daño yatrogénico

Tabla 1.2. Enfermedades asociadas a neovascularización corneal [20].

1.1.3.1. Infecciones oculares

La NVC es una complicación potencial de numerosas **infecciones bacterianas, fúngicas, parasitarias y virales**.

El **tracoma**, una infección ocular causada por la *Chlamydia trachomatis*, es la principal causa infecciosa de ceguera. Según la OMS, se estima que 5,9 millones de personas están ciegas o con un riesgo alto de ceguera por triquiasis traco-

matosa [23]. Episodios recurrentes de tracoma pueden dañar los párpados, produciendo abrasiones corneales inducidas por las pestañas, neovascularización y cicatrización [24].

La segunda causa más común de ceguera infecciosa en todo el mundo es la **oncocercosis**, comúnmente denominada ceguera de los ríos [25]. La mayor parte de la carga global de oncocercosis se encuentra en el África subsahariana. En 1995, se estimó que esta filariasis había producido la ceguera a 404.000 personas. Sin embargo, esta enfermedad se ha eliminado en gran parte gracias al *Programa de Control de la Oncocercosis* (1974-2002) que se basa en un intenso control de los vectores y el tratamiento masivo con el medicamento ivermectina. La córnea se afecta por la migración de microfilarias producidas por los nemátodos provocando una intensa inflamación, neovascularización y opacificación [26].

El **virus herpes simple (VHS)** es la causa más común de ceguera corneal en el mundo desarrollado. Los seres humanos son el único reservorio natural del virus. La enfermedad por VHS es una causa de morbilidad ocular y es una causa común de opacificación corneal y pérdida de agudeza visual. Entre los 15 y 25 años de edad el 70% de la población ha sido infectada y a los 60 años el 97%, presentando afectación por la enfermedad ocular herpética el 0,17%. Los episodios recurrentes de queratitis por VHS pueden causar neovascularización, opacificación y cicatrización [27].

1.1.3.2. Traumatismos oculares

El trauma ocular da lugar a 19 millones de casos de pérdida de visión unilateral y a 1,6 millones de casos de ceguera bilateral en todo el mundo [28]. La curación de la herida corneal es generalmente un proceso avascular; sin embargo, la NVC puede desarrollarse en respuesta a lesiones graves de la córnea [15].

Las quemaduras químicas (alcalinas y ácidas), en particular, inducen una respuesta inflamatoria vigorosa que promueve la NV corneal. Además, las quemaduras químicas pueden dañar el limbo corneal dando lugar a una deficiencia de células limbares. Se puede desarrollar la conjuntivalización de la superficie corneal con neovascularización masiva, dando lugar a graves reducciones en la transparencia corneal y en la agudeza visual a través de la formación de un pannus en el tejido corneal superficial [17, 29, 30].

1.1.3.3. Neoplasias, enfermedades degenerativas y enfermedades inflamatorias

Las neoplasias de la superficie ocular, tales como el papiloma y la neoplasia intraepitelial corneal y conjuntival, pueden causar la NVC como parte de la respuesta angiogénica al tumor. Las condiciones degenerativas tales como el pterigium y la proliferación queratoconjuntival difusa usualmente se acompañan de un pannus fibrovascular situado encima del estroma corneal. La irritación crónica de la superficie ocular como la que se produce en la queratoconjuntivitis atópica perenne también puede causar una agresiva NVC. Otras etiologías específicas de NVC incluyen: conjuntivitis atópica, rosácea, penfigoide ocular, rechazo del injerto, síndrome de Lyell, síndrome de Stevens-Johnson, enfermedad de injerto contra el huésped, rechazo de aloinjerto corneal y edema corneal persistente como en la queratopatía bullosa y el hidrops crónico del queratocono. Otras causas menos comunes de NVC son la exposición al sol, la radiación o las toxinas químicas como el gas mostaza [15, 31, 32].

1.1.3.4. Deficiencia de células limbares

La deficiencia de células madre es una anomalía corneal grave que puede ocurrir en una variedad de enfermedades oculares tanto adquiridas (ej. quemaduras químicas, uso de lentes de contacto, drogas, etc.) como congénitas (ej. aniridia) y es debida a la pérdida parcial o total de las células madre del limbo. La alteración del limbo corneal conduce a un daño corneal y proporciona una vía para la extensión del epitelio conjuntival y los vasos sanguíneos a la córnea [29]. Esta enfermedad da lugar a la conjuntivalización de la córnea con vascularización, aparición de células caliciformes, y epitelio inestable e irregular [33].

1.1.3.5. Hipoxia relacionada con las lentes de contacto

Aproximadamente 125 millones de personas en todo el mundo utilizan lentes de contacto. El uso de lentes de contacto se ha asociado con una gran variedad de complicaciones inflamatorias [34]. La hipoxia relacionada con el uso de lentes de contacto es una causa común de NVC usualmente superficial y localizada en

la córnea periférica [35]. Los factores de riesgo incluyen el uso prolongado de las lentillas de contacto, la utilización de lentillas con baja permeabilidad al oxígeno, y la contaminación de las mismas [36].

1.1.3.6. El trasplante de córnea y neovascularización corneal

Como hemos descrito anteriormente, la NVC se asocia con un amplio número de enfermedades que pueden llevar a la opacificación corneal pudiendo ser necesaria la realización de un trasplante corneal (queratoplastia). El trasplante de córnea realizado en lechos corneales ausentes de inflamación y vascularización, denominados trasplantes de bajo riesgo, tienen altas tasas de supervivencia del injerto cercanas al 90%. Así pues, un lecho corneal avascular se considera generalmente como un factor favorable para la supervivencia del injerto a largo plazo [37, 38].

Sin embargo, el trasplante de córnea realizado en lechos corneales previamente inflamados y vascularizados, denominados trasplantes de alto riesgo, tienen una tasa de éxito mucho más baja. La NVC proporciona el acceso del sistema inmune al injerto incrementando el riesgo de rechazo inmune alógeno [39]. Por ello, la NVC es el factor más importante a la hora de evaluar el riesgo de rechazo, que oscila entre un 0-10% en córneas avasculares y un 25-50% en córneas gravemente vascularizadas [15, 20, 40-42].

1.2. ANGIOGÉNESIS CORNEAL

1.2.1. Crecimiento vascular: vasculogénesis y angiogénesis

Durante el desarrollo embriológico, la formación *de novo* de los capilares tiene lugar en cada órgano mediante un proceso denominado **vasculogénesis**. En este proceso están implicadas las células precursoras de los vasos sanguíneos denominadas angioblastos, las cuales comparten con las células hematopoyéticas un progenitor común originado en el mesodermo: el hemangioblasto. Agregados de angioblastos se diferencian en células endoteliales y se alinean en un lumen

que contiene las células precursoras sanguíneas. La fusión de estas “islas de sangre” forma los llamados plexos capilares primarios [43, 44].

La **angiogénesis** ocurre en los adultos de forma fisiológica durante la curación de las heridas, el embarazo y el ciclo uterino. Sin embargo, la angiogénesis también tiene un papel importante en procesos patológicos como el crecimiento de tumores y las metástasis, así como la neovascularización ocular [45, 46]. Se define como la formación de estructuras vasculares sanguíneas nuevas en áreas que eran previamente avasculares. Este proceso conlleva el brote y la invaginación, la maduración funcional de las células endoteliales y el reclutamiento de las células musculares lisas y los pericitos [44]. Los mecanismos y los mediadores de la angiogénesis patológica se sabe que difieren algo de la angiogénesis fisiológica, como por ejemplo el hecho de que la última no se suele acompañar del componente inflamatorio [47]. Las etapas de la angiogénesis se describirán en el apartado 1.2.3.

La **linfoangiogénesis** se define como la formación de nuevos vasos linfáticos a partir de otros preexistentes.

1.2.2. El sistema vascular limbar y la neovascularización corneal

La arcada limbar tiene origen en el plexo pericorneal, un anillo de vasos conectados localizados a 1-5 mm detrás del limbo, donde se dividen y terminan las arterias ciliares anteriores (ramas de la arteria oftálmica). Desde este anillo vascular, las arteriolas brotan hacia el limbo configurando la pericórnea o arcada limbar. Los bucles vasculares se posicionan debajo de la capa de Bowman la cual representa la barrera natural del brote de vasos hacia la córnea (Figura 1.5) [48].

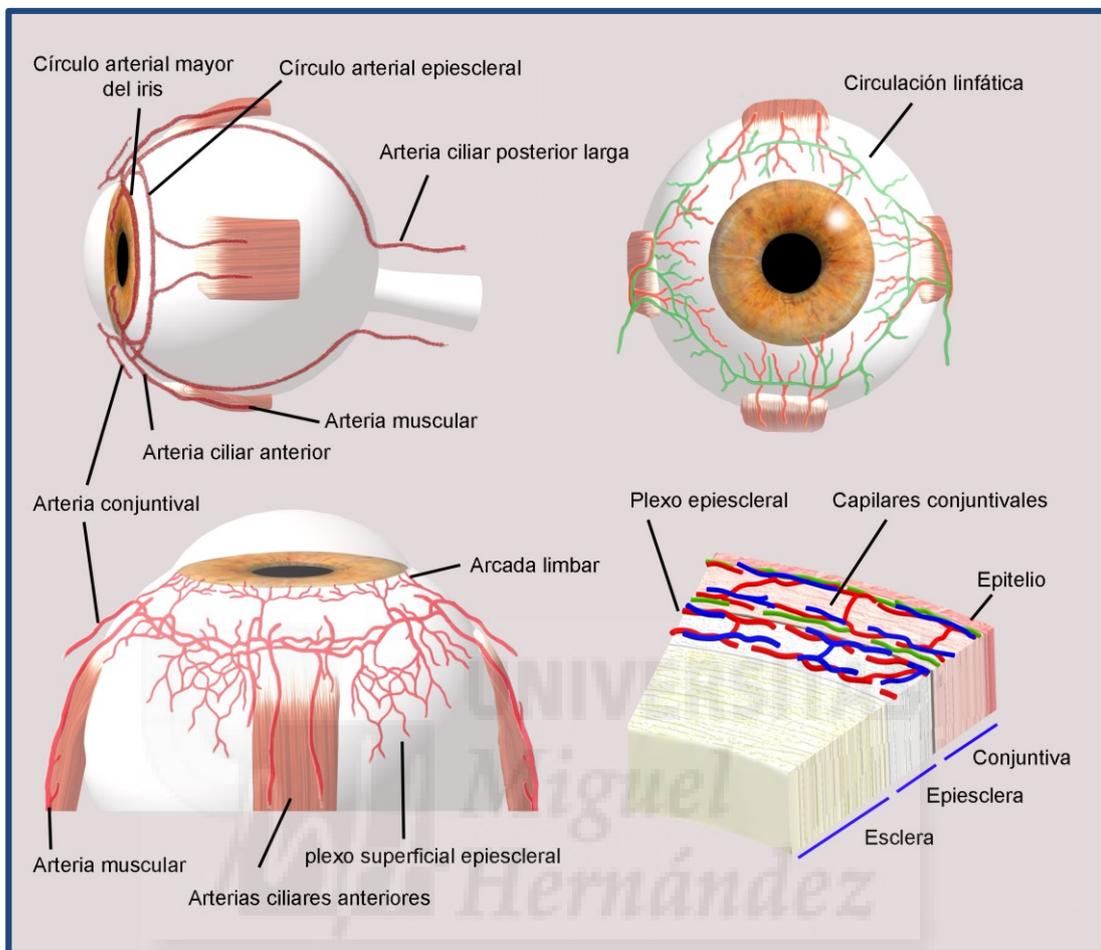


Figura 1.5. Vasculatura del segmento anterior del ojo

Los **capilares** del limbo están constituidos por una capa interna de células endoteliales los cuales están cubiertos por una membrana basal. Alrededor de la membrana se sitúan los pericitos que circundan los vasos (Figura 1.6). [49].

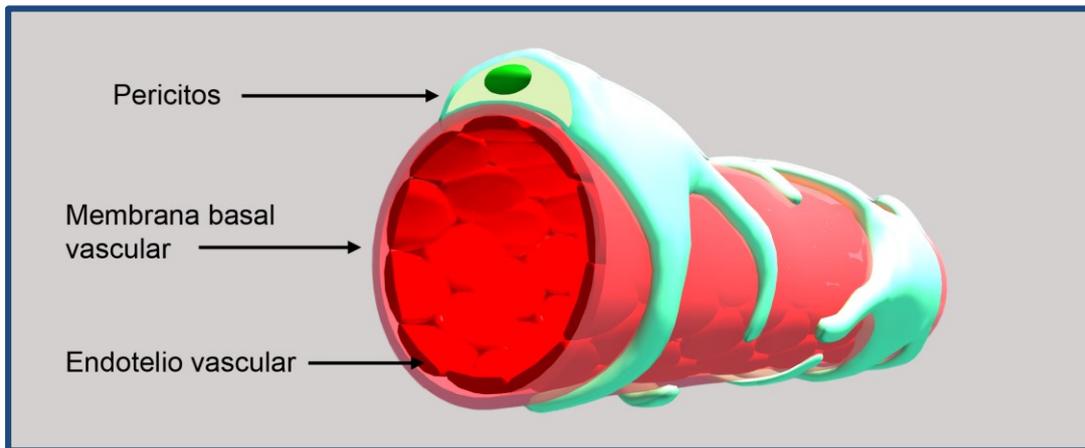


Figura 1.6. Estructura de los capilares del limbo. Los capilares están constituidos por una capa de células endoteliales cubiertas por una membrana basal. Alrededor se sitúan los pericitos.

Los vasos linfáticos limbares forman un anillo que se conecta con la red linfática conjuntival. Los vasos limbares juegan un papel importante en el reclutamiento de células inmunes hacia el tejido adyacente y probablemente son el origen de los vasos linfáticos patológicos que invaden la córnea inflamada disminuyendo de forma significativa el riesgo de supervivencia del trasplante de córnea [50].

1.2.3. Etapas de la angiogénesis

La neovascularización corneal implica el brote de nuevos vasos sanguíneos que emergen de capilares y vénulas del plexo limbar. La angiogénesis es un proceso complejo, caracterizado por una cascada de eventos que incluyen una vasodilatación inicial de los vasos acompañada de un aumento de la permeabilidad vascular y degradación de la matriz extracelular vecina, la cual permite activar la proliferación de las células endoteliales vasculares (CEv), la migración de las mismas y la formación del tubo vascular [51]. Cada una de estos pasos está estrechamente regulado por la acción de moléculas estimuladoras (factores proangiogénicos) y moléculas inhibitoras (factores antiangiogénicos) [47]. El equilibrio de los factores proangiogénicos y antiangiogénicos delimita el proceso de la angiogénesis.

Podemos distinguir las siguientes etapas:

1.2.3.1. Disparador del cambio angiogénico

En condiciones normales, los vasos se encuentran en un estado quiescente debido al dominio de los inhibidores de la angiogénesis. Sin embargo, en condiciones de hipoxia o inflamación, se activan los factores angiogénicos y el balance cambia a favor de la angiogénesis produciéndose un evento conocido como “**cambio angiogénico**” [52]. La hipoxia es un importante regulador de la angiogénesis que actúa sobrerregulando la transcripción del factor inducido por la hipoxia (HIF)-1 α , el cual se liga al promotor de VEGF-A para promover su transcripción [53]. Así pues, la hipoxia incrementa los niveles de VEGF y un aumento concomitante de la expresión VEGFR-2 para inducir la angiogénesis [51].

Durante la neovascularización corneal inflamatoria, el daño del epitelio y del estroma corneal produce un aumento de la interleuquina 1 (IL-1), la cual regula positivamente la expresión de la molécula de adhesión molecular 1 (ICAM-1) en las células endoteliales de los vasos linfáticos limbares que permite la invasión de células inflamatorias, principalmente neutrófilos. La respuesta inflamatoria produce la vasodilatación de los vasos del plexo corneal con el subsecuente aumento de la permeabilidad y diapédesis leucocitaria precediendo y acompañando a los fenómenos angiogénicos. Generalmente, la vasodilatación ocurre a partir de la primera hora después de que se produzca el estímulo inflamatorio. VEGF incrementa la permeabilidad del vaso, permitiendo la extravasación de proteínas plasmáticas como fibronectina y fibrinógeno que son depositados como una capa de matriz provisional mientras que la matriz intersticial preexistente es remodelada por las proteasas. Todos estos eventos habilitan la migración de las CEv [54].

1.2.3.2. Proceso de gemación de los vasos

La señal de la molécula VEGF juega un papel central en la angiogénesis [55]. Así pues, tras el estímulo angiogénico, el endotelio de la microcirculación comienza a hipertrofiarse y aumentar el número de proyecciones en la superficie luminal. Las células endoteliales en el frente del brote vascular extienden sus filopodias y migran hacia las señales angiogénicas.

La migración celular requiere la degradación de la membrana basal vascular producida en parte por las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs). Las uniones célula-célula endoteliales se pierden a causa de VE-cadherina, Zo-1 entre otras moléculas y los pericitos se desprenden regulados por la Ang-2 [54]. Los pericitos son células adventicias que se localizan en la membrana basal de los capilares y vénulas postcapilares. Durante esta fase, los pericitos de los vasos progenitores se activan, acortan sus procesos e incrementan su volumen, la membrana basal se disrumpe y se fragmenta y, finalmente, los pericitos se desprenden de la pared de los vasos [56]. Aunque inicialmente los brotes de células endoteliales se forman sin el recubrimiento de los pericitos, los pericitos son los primeros en invadir los nuevos tejidos vascularizados y se localizan en el frente de crecimiento de la formación de los brotes de CEv guiando los nuevos vasos formados [57] (Figura 1.7).

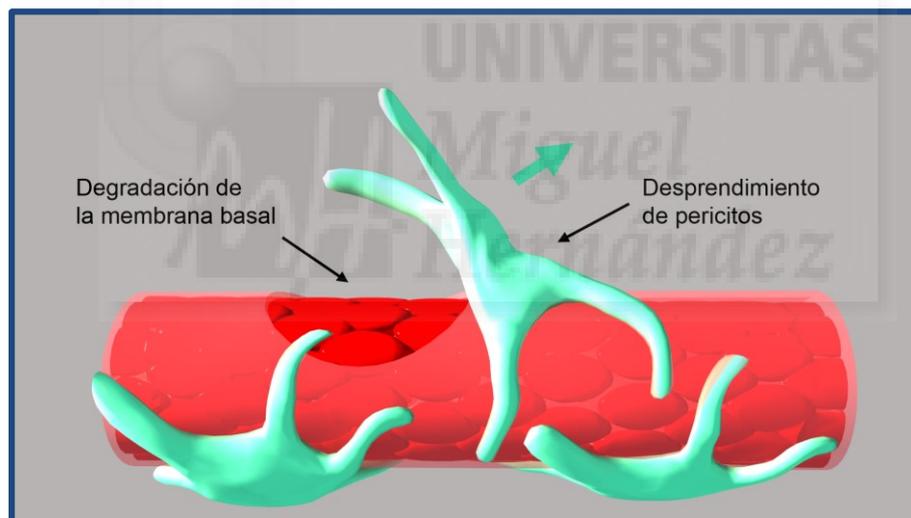


Figura 1.7. Degradación de la membrana basal vascular y desprendimiento de los pericitos.

Este proceso de gemación (sprouting) consiste en una diferenciación coordinada de las células endoteliales en respuesta al VEGF del medio extracelular. Durante el sprouting, una CEv abandona la quiescencia y se diferencia a “células punta” (tip cells), y las células endoteliales adyacentes a la célula punta se diferencian a “células tallo” (stalk cells). VEGF, a través de su receptor VEGFR-2 estimula la migración de la célula. El correceptor Neuropilina-1 (Nrp-1) completa y potencia

la señal de VEGFR-2. La célula punta tiene un fenotipo migratorio y es atraída por el gradiente de VEGF, mientras que las células tallo son eminentemente proliferativas, por lo que se dividen formando las paredes que constituirán el nuevo vaso (Figura 1.8) [58, 59].

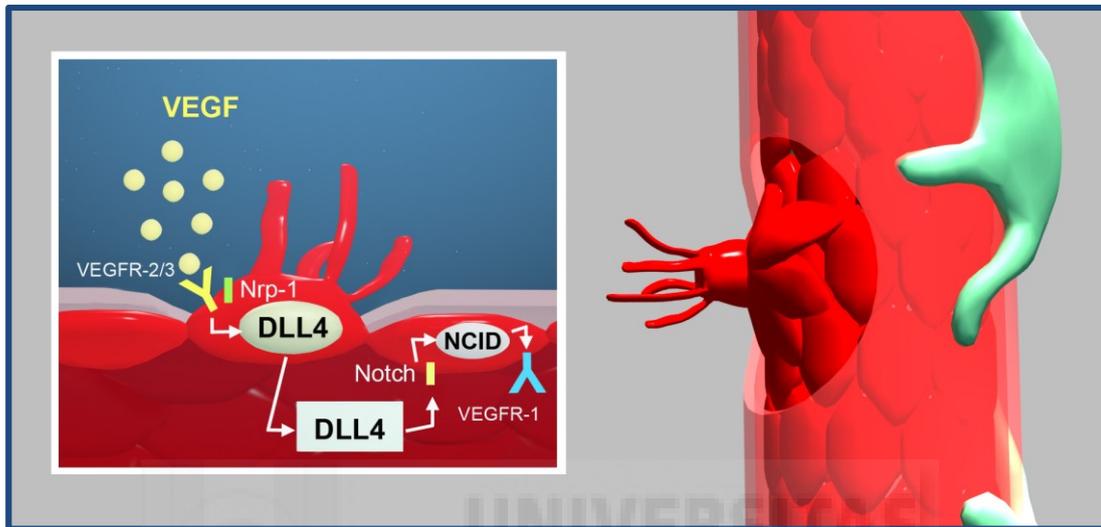


Figura 1.8. Proceso de gemación de los vasos. Los pericitos se dependen y la célula endotelial, activada por VEGF a través del receptor VEGFR-2, compete por transformarse en célula punta produciendo DLL4, un ligando que se une al receptor Notch de las células vecinas liberando el regulador de transcripción NICD que infrarregula la expresión de VEGFR-2 e incrementa la de VEGFR-1 que, a su vez, actúa como receptor señuelo secuestrador de VEGF.

La CEv se puede convertir tanto en una célula punta o en una célula tallo presentando un fenotipo fluido y siendo el receptor transmembrana Notch el que regula su especificación. Cuando la CEv es activada por la señal de VEGFR-2 compete por conseguir un fenotipo punta incrementando su expresión del ligando de Notch (DLL4), el cual se liga a receptores en las células vecinas liberando el regulador de transcripción NICD. NICD infrarregula la expresión de VEGFR-2 y Nrp-1 mientras que incrementa la del receptor VEGFR-1 que actúa como una trampa para VEGF, potenciando la falta de respuesta de estas células a VEGF. La célula punta no está en una situación rígida y su fenotipo y fluidez en el frente de vascularización dependerá de la ratio VEGFR-1/VEGFR-2 [54, 60].

1.2.3.3. La elongación del tallo vascular

El brote vascular en crecimiento se mueve siguiendo el gradiente de VEGF. Las células punta se adhieren a la matriz extracelular, mediadas por integrinas y migran hacia las moléculas señalizadoras (semaforinas y efrinas). Las células tallo siguen detrás de la célula punta y proliferan para permitir la elongación del tallo y la formación del lumen. Mientras la señal Notch inhibe la proliferación, la expresión de una proteína denominada Nrarp en los puntos de ramificación limita la función inhibitoria de Notch y permite que la proteína de señalización Wnt mantenga la proliferación de la célula endotelial y la estabilidad del tallo [61]. El sistema favorece la migración vascular, la direccionalidad por las células punta y la proliferación del eje por las células tallo proliferantes (Figura 1.9).

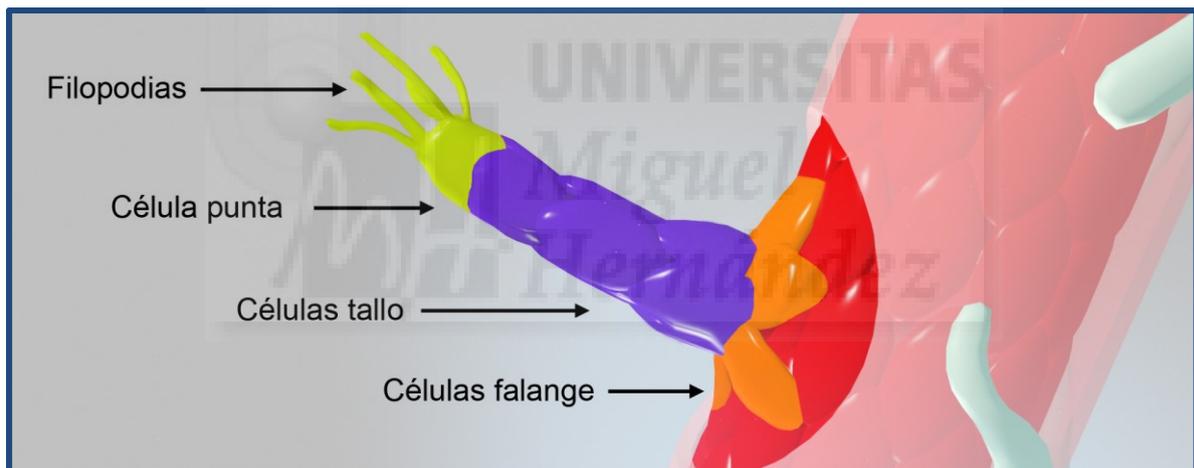


Figura 1.9. Tipos de células del brote vascular.

Cuando dos células punta se encuentran, se fusionan (anastomosis). Los macrófagos asisten este procedimiento acumulándose en los lugares de anastomosis para actuar como células puente que interactúan con las filopodias de las células punta vecinas [62]. Una vez que el contacto entre las células punta se ha establecido, las uniones que contienen VE-cadherina fortalecen más la conexión. Los macrófagos perivasculares además estimulan los brotes produciendo factores angiogénicos o liberándolos mediante proteólisis de la membrana extracelular (Figura 1.10) [54].

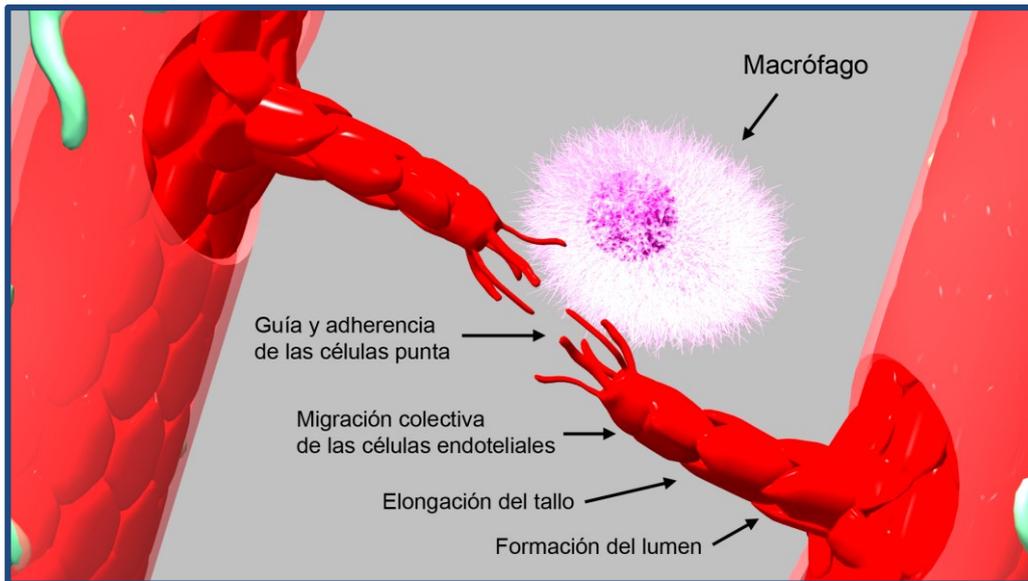


Figura 1.10. Migración de células endoteliales vasculares. Las células punta migran hacia las moléculas señalizadoras seguidas de las células tallo para favorecer la elongación del neovaso y la formación del lumen. Cuando dos células punta se encuentran se anastomosando siendo los macrófagos las células que coordinan este proceso.

1.2.3.4. Estabilización y maduración de los vasos recién formados

La perfusión del tejido hipóxico aporta el suministro de oxígeno y nutrientes necesarios disminuyendo los niveles de señales angiogénicas, inactivando los sensores de oxígeno de las CEV e incrementando las moléculas proquiescentes de los vasos. El establecimiento del flujo de sangre remodela las conexiones vasculares, las cuales son reguladas por el factor de transcripción de respuesta al estrés KLF2. Las CEV se convierten en un tercer tipo celular, las “células falange” (*phalanx cells*) que mantienen la unión del nuevo capilar con el vaso originario. Estas células apositadas estrechamente constituyen una monocapa con una superficie aerodinámica que conduce el flujo de sangre y regula la perfusión del tejido. La perfusión induce la maduración vascular y el restablecimiento de las uniones célula-célula, la maduración del pericito y la formación de la membrana basal [54].

Las señales autocrinas y paracrinas (VEGF, FGF, Ang1, Notch, etc.) desde las CEV y las células de soporte mantienen el fenotipo de quiescencia de las CEV y protegen al vaso sanguíneo del estrés ambiental [63]. Una vez estabilizado y madurado, el vaso forma barreras entre la sangre y el tejido vecino, controlando el

intercambio de fluidos y otros solutos. La reducción de la señalización de los factores de crecimiento puede llevar a la retracción del vaso y la apoptosis de la célula endotelial [54].

Una vez la fusión ha ocurrido, el lumen conectado es formado para permitir que la sangre fluya a través del nuevo vaso. Las células tallo depositan membrana basal vascular y reclutan pericitos estabilizando, de este modo el vaso formado. Los precursores de los pericitos son atraídos a los vasos por el PDGF expresado por las CEV. Una vez que llegan al vaso, estos precursores mesenquimales se diferencian en pericitos en respuesta al TGF- β . [54]. Los pericitos son generalmente considerados como las células destinadas a la estabilización de la pared del vaso controlando la proliferación de las CEV y, por tanto, el crecimiento de los nuevos vasos. Además, se piensa que participan en la regulación del flujo de sangre microvascular a través de mecanismos contráctiles [64]. Numerosas moléculas están implicadas en el control y modulación de las interacciones que ocurren entre los pericitos y las células endoteliales, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-B), el factor de crecimiento beta (TGF- β), VEGF, angiopoyetinas (Angs) y vías de señalización que implican a Notch y las efrinas (Figura 1.11) [65, 66].

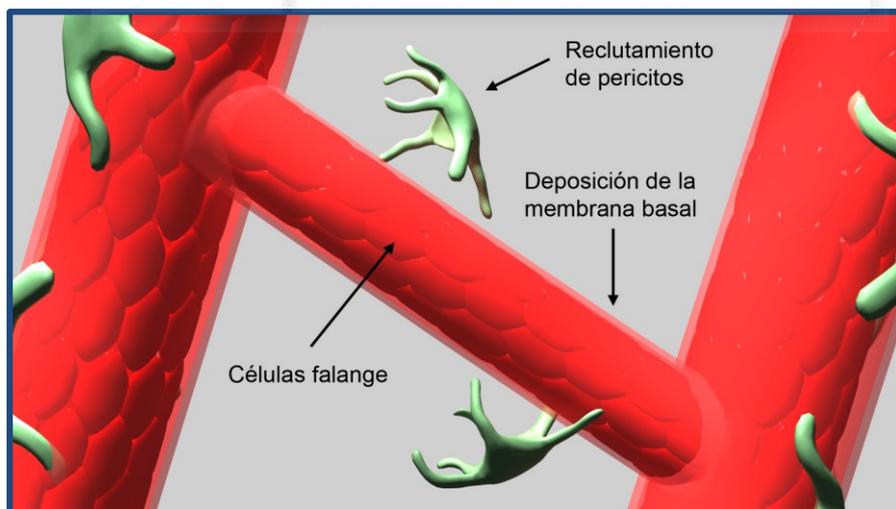


Figura 1.11. Proceso de estabilización y maduración del vaso. Las CEVs adquieren el fenotipo de células falange, se forma la membrana basal y los neovasos son revestidos por los pericitos.

Tras dos semanas de iniciarse el proceso de neovascularización, el 80% de los capilares neoformados son cubiertos por pericitos [49]. La formación de la membrana basal y el revestimiento de los capilares por los pericitos está generalmente asociado al final del estado proliferativo y al comienzo de la maduración o función del capilar en su estado quiescente [64]. Las interacciones entre el pericito y la célula endotelial regulan el aumento de la expresión de proteínas de la membrana basal como fibronectina y laminina, así como las integrinas que reconocen las matrices remodeladas para controlar este proceso [67].

Los vasos de la córnea ya establecidos no desaparecen pero pueden regresar al cesar el estímulo angiogénico, persistiendo los denominados vasos fantasmas [21].

1.2.4. Avascularidad corneal: el privilegio corneal angiogénico y linfangiogénico de la córnea

La avascularidad de la córnea ha estado altamente conservada durante la evolución, así que en todos los vertebrados los cuales dependen de una buena visión la córnea está libre de vasos sanguíneos y linfáticos. La avascularidad de la córnea se mantiene a pesar de la exposición intermitente a estímulos inflamatorios potencialmente proangiogénicos y en condiciones de hipoxia. Además, la córnea es capaz de permanecer avascular en el seno de un daño significativo (ej. cirugía refractiva), y la curación de las heridas es generalmente un proceso avascular. Esto es debido a que en estos tejidos se ponen en marcha unos mecanismos que inhiben el crecimiento de los neovasos [15].

El hecho de que la córnea normal esté libre de vasos sanguíneos y linfáticos y su capacidad para inhibir activamente el crecimiento de los vasos se ha denominado **“privilegio angiogénico de la córnea”** en analogía al “privilegio inmune” de la córnea, el cual denota la resistencia inherente de la misma a mostrar inflamación. Este privilegio angiogénico no es un estado pasivo ya que envuelve la activación de diferentes cascadas metabólicas [68].

Tal como hemos comentado anteriormente, la córnea tiene una anatomía especial que incluye la deshidratación constante que da lugar a lamelas de colágeno altamente comprimidas y la presencia de redes de queratocitos compactados entre las lamelas. En caso de edema corneal se altera la compactación del estroma

y no sólo se pierde la transparencia de la córnea debido al depósito de agua, sino que también las citoquinas inflamatorias son liberadas y los vasos pueden crecer más fácilmente entre las lamelas. Aunque la descompensación e hidratación de la córnea puede ocurrir sin crecimiento de vasos, habitualmente la NVC se asocia con el edema. Además, existen varios mecanismos biológicos que contribuyen al privilegio corneal angiogénico y linfangiogénico [69] a) el efecto angiostático de las células corneales; b) los mecanismos antiangiogénicos mediante señuelo; c) moléculas antiangiogénicas de la córnea y d) vías de señalización de la muerte celular (Tabla 1.3).

FACTORES ANTIANGIOGÉNICOS QUE CONTRIBUYEN A LA AVASCULARIDAD DE LA CÓRNEA
Moléculas antiangiogénicas de la córnea
Angiostatina
Factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF)
Fragmentos derivados del colágeno: Endostatina, Canstatina, Arrestina, Tumstatina
Trombospondinas: TPS-1 y TPS-2
Algunas metaloproteinasas de la matriz (MT1-MMP, MMP-7)
Inhibidores de las metaloproteinasas
Inhibidor de la activación del plasminógeno
Mecanismos antiangiogénicos mediante señuelo
Algunos receptores del VEGF: sVEGFR-q, mVEGFR-3
Otras moléculas antiangiogénicas de la córnea
Citoquinas: IL-10, IP-10/CXCL10
Angiopoyetina-2 (Ang-2) (contexto dependiente: con bajas concentraciones de VEGF)
Vías de señalización de la muerte celular
Fas/Fas-L
CD80/PD-L1

Tabla 1.3. Mecanismos biológicos que contribuyen al privilegio corneal angiogénico y linfangiogénico.

Las células del epitelio corneal contribuyen a su naturaleza angiostática. Estudios en cultivos celulares han demostrado que los queratocitos estromales tienen un efecto estimulador de la NVC. Por el contrario, las células del epitelio limbal tienen un efecto inhibitorio de la angiogénesis funcionando como una barrera contra la angiogénesis y la linfangiogénesis en el tejido corneal inmediato.

Además, la región limbar contiene células madre (*stem cells*) que abastecen desde la periferia a la córnea con células epiteliales [8, 70].

Se han identificado numerosas moléculas antiangiogénicas en la córnea. Estas pueden ser directamente producidas en sus formas activas, o bien, pueden ser derivadas de precursores de mayor tamaño mediante clivaje proteolítico: angiostatina endógena, factor derivado del epitelio pigmentario, fragmentos derivados del colágeno (endostatina, arrestina, canstatina, tumstatina) y trombospondinas. Los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMPs) son unos inhibidores específicos endógenos que reducen la excesiva degradación proteolítica producida por las MMPs. Este balance entre las MMPs y los TIMPs juega un papel relevante en la angiogénesis y la remodelación tisular [71].

Además, en el epitelio corneal existen varios mecanismos de receptores señuelo que secuestran moléculas con capacidad angiogénica, limitando su actividad y actuando como reguladores del complejo proceso de la angiogénesis (VEGFR-1 soluble, sVEGFR-2 soluble y ectópico) [72-74].

1.3. PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DE LA ANGIOGÉNESIS

1.3.1. Los promotores de la angiogénesis corneal

Para mantener lo que se denomina el “privilegio angiogénico” de la córnea existe un balance dinámico entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos [45]. A pesar de este balance, determinadas condiciones patológicas pueden anular los innatos mecanismos de defensa antiangiogénicos de la córnea, e incluso comprometer el estado avascular de la córnea [15, 75]. En la Tabla 1.4 se muestran los factores estimuladores de la angiogénesis.

Una gran variedad de estudios preclínicos y clínicos sugieren que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) juega un papel clave en la neovascularización patológica. VEGF se une a tres receptores estrechamente relacionados estructuralmente que poseen una actividad tirosina quinasa intrínseca. Mientras que los datos disponibles sugieren fuertemente que VEGF actúa como el mayor estimulador de la NVC, otros factores de crecimiento que actúan sobre receptores

tirosina quinasa están implicados en la neovascularización (PDGF, FGF, angiopoietinas, etc.) [76]. La estructura y función de los receptores tirosina quinasa y sus ligandos se desarrollan en los siguientes apartados.

Durante la angiogénesis, es esencial la degradación y remodelamiento de la matriz extracelular y de la membrana basal para facilitar la invasión y migración de las células endoteliales vasculares. Es por tanto necesario una actividad cooperativa de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y el sistema fibrinolítico de activación del plasminógeno implicados en la degradación de la matriz y el correcto recambio del tejido conectivo [51, 77]. La participación de las MMPs en la angiogénesis parece ser ambigua porque la misma molécula puede actuar como un factor proangiogénico o antiangiogénico según el contexto [15]. Esta función dual de las MMPs durante la angiogénesis puede ser debida a su capacidad para degradar la matriz extracelular, permitiendo la invasión del tejido por las células endoteliales, y por la facultad para generar o liberar fragmentos antiangiogénicos a partir de precursores [78]. El sistema fibrinolítico juega un papel importante en situaciones en las que se produce la proteólisis tisular como la inflamación, la invasión tumoral y la neovascularización. La activación de plasminógeno a plasmina conduce a la progresiva degradación de la fibrina y otros componentes de la matriz extracelular, así como a la activación de metaloproteasas, factores de crecimiento latentes y proteólisis de glicoproteínas de membrana [79].

Por otro lado, la inflamación es una característica compartida por todas las etiologías de la NVC. Las citoquinas como IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β) activan las células inflamatorias [80]. Las células inflamatorias son fuentes ricas de moléculas de VEGF que promueven la hemangiogénesis y la linfangiogénesis y la quimiotaxis de otras células inflamatorias que amplifican la cascada angiogénica [39]. Otras moléculas como las integrinas y la endotelina 1 (ET-1) también realizan una función proangiogénica.

PROMOTORES DE LA ANGIOGÉNESIS QUE PROMUEVEN LA NVC	
Factores que actúan sobre receptores tirosina quinasa	
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) Angiopoyetinas (Ang-1 ± Ang-2)	
Enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular	
Metaloroteinasas de la matriz: MMP-2 (Gelatinasa A), MMP9 (Gelatinasa B), MT-MMP-1 Serinas proteasas del sistema fibrinolítico	
Mediadores de la inflamación	
Citoquinas/quimiocinas: IL-1, IL-8/CXCL-8,	
TNF- α	
TGF- β 1 (contexto dependiente: <i>in vivo</i>)	
Otras moléculas	
Integrinas: α V β 3; α 1 β 1	
Endotelina-1	
ESAF	

Tabla 1.4. Factores que promueven la angiogénesis.

1.3.2. Receptores tirosina quinasa de los factores de crecimiento

Las quinasas también llamadas fosfotransferasas, son enzimas que transfieren grupos fosfatos de moléculas donantes de alta energía, por ejemplo, adenosin trifosfato (ATP) a sustratos específicos. Las proteínas quinasa fosforilan proteínas resultando en cambios funcionales de proteínas diana. De las 518 proteínas quinasas codificadas en el genoma humano, 90 quinasas pertenecen al grupo tirosina quinasa. El grupo tirosina quinasa consta de aproximadamente 30 familias, por ejemplo, las familias VEGFR, PDGFR, FGFR y Tie. Además de la clasificación en familias, las tirosinas quinasas también pueden clasificarse en receptores tirosina quinasa y no receptores (citoplasmáticos). Los receptores tirosina quinasa son esenciales para la transducción de señales dentro de la célula, mientras que los no-receptores tirosina quinasa realizan comunicaciones intracelulares.

Los receptores tirosina quinasa (RTQ) desempeñan un papel crucial en el control de los procedimientos celulares básicos como la proliferación, la migración,

el metabolismo, la diferenciación y la supervivencia celular, así como la regulación de la comunicación intercelular durante el proceso del desarrollo [81, 82].

La mayoría de los ligandos que activan estos receptores son factores de crecimiento, incluyendo el VEGF, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), las angiopoyetinas, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la insulina. [81-83]. En el punto 1.3.2 describiremos los factores más relevantes.

Los RTQ son un tipo de receptores transmembránicos asociados a enzimas. Los receptores asociados a enzimas están constituidos por glicoproteínas transmembrana que, a diferencia de los receptores acoplados a proteínas G, atraviesan la membrana citoplasmática una sola vez. Se activan por unión de sus ligandos y transducen señales extracelulares al citoplasma. Basado en la presencia o ausencia de actividad catalítica en el dominio citosólico, estos receptores se clasifican en receptores con actividad enzimática intrínseca y receptores sin actividad enzimática propia pero capaces de asociarse a enzimas citoplasmáticas. Por tanto, poseen capacidad de catalizar la transferencia de grupos fosfatos de la molécula de ATP a los grupos hidroxilo de aquellas tirosinas que pueden estar tanto presentes en los propios receptores como en determinadas proteínas (sustratos) susceptibles de ser fosforiladas por dichos receptores. Esta característica les confiere su nombre denominándose receptores tirosina quinasa (RTQs) [81-83].

1.3.2.1. Estructura y función de los receptores tirosina quinasa

Estructuralmente, el monómero del receptor tirosina quinasa (RTQ) está constituido por tres partes (Figura 1.12):

- a) El **segmento extracelular**, de varios cientos de aminoácidos, posee un dominio de unión al ligando. El dominio de unión al ligando está compuesto por combinaciones de secuencias reconocibles de regiones cisteína, secuencias homólogas a la inmunoglobulina y secuencias repetitivas de fibro-

nectina. Las funciones de estas secuencias no han sido aclaradas, pudiendo participar en mantener la estructura del receptor, seleccionar el ligando, dimerización del receptor o interactuar con otras proteínas.

- b) La **porción transmembrana** es una hélice, consiste en un tramo de residuos hidrofóbicos seguidos por varios residuos básicos.

- c) La **porción intracelular citoplasmática** que contiene el dominio tirosina quinasa, así como otras secuencias reguladoras que pueden ser susceptibles de fosforilación. El dominio quinasa tiene una estructura bi-lobular, con una hendidura localizada entre el lóbulo N-terminal y el lóbulo C-terminal. El sitio de unión a ATP puede a su vez dividirse en 3 subregiones: la región de adenina, la región de azúcares y la región de unión al fosfato. El lóbulo C-terminal contiene un bucle de activación y está marcado por una combinación de aminoácidos específicos al principio del bucle. Esta combinación está compuesta por los aminoácidos: ácido aspártico, fenilalanina y glicina, abreviados como D, F y G respectivamente y llamados, de este modo “motivo DFG”. La activación del bucle puede adoptar numerosas conformaciones. En la conformación “out” la activación del bucle crea un bolsillo hidrofóbico cercano a la hendidura de unión al ATP. Este bolsillo hidrofóbico es importante para un subgrupo de inhibidores tirosina quinasa que se describirá posteriormente [84].

Todos los RTQs, contienen una cadena polipeptídica única y son monómeros con excepción del receptor de la insulina que es un heterotetramero [83].

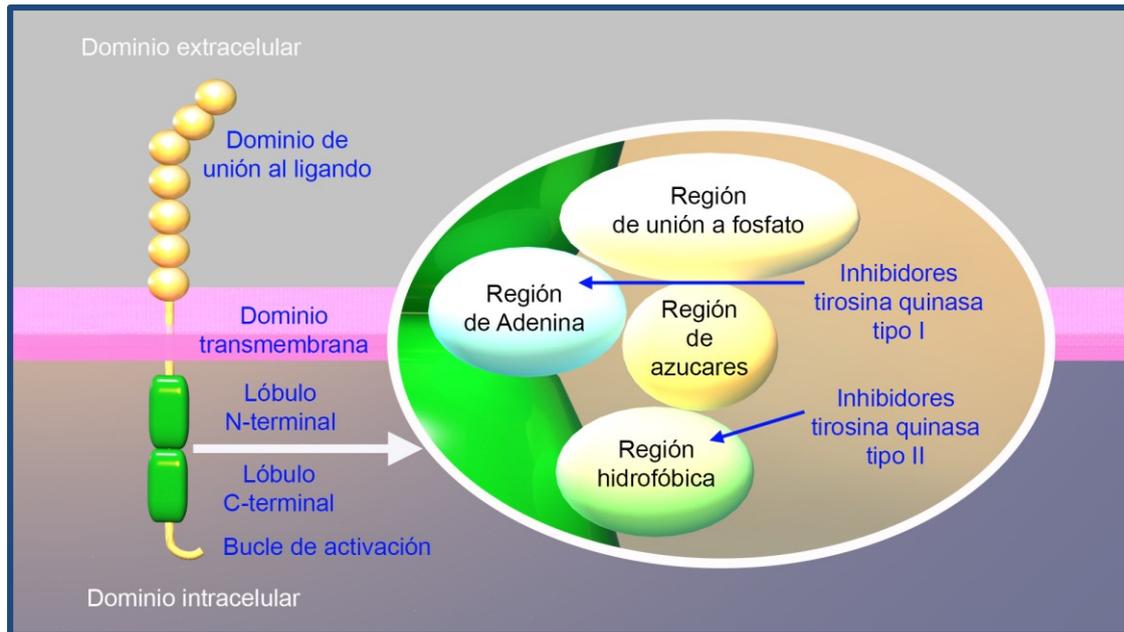


Figura 1.12. Estructura del monómero del receptor tirosina quinasa. El dominio extracelular de un RTQ puede unir ligandos específicos como factores de crecimiento, mientras que el dominio intracelular logra la (auto)fosforilación de la quinasa. Los dominios extra- e intracelular son divididos por la región transmembrana que está anclada en la membrana de la célula. La hendidura de unión al ATP está localizada entre los lóbulos del dominio intracelular. A la derecha, se muestra una representación esquemática de la hendidura de unión a ATP con sus diferentes regiones. Se indican las regiones de unión de los ITQs de tipo I y II que se describirán posteriormente [84].

En la señalización a través del RTQ podemos distinguir tres etapas: 1) unión del factor de crecimiento al receptor, 2) activación del receptor mediante la fosforilación de su porción intracelular, y 3) transducción de señales a través de diversas vías moleculares.

1.3.2.2. Activación del receptor: dimerización y autofosforilación

Los receptores deben dimerizarse para que la señal desencadenada por la unión del ligando al dominio extracelular genere un cambio conformacional en la estructura del propio receptor. Los contactos entre los dominios citosólicos al realizarse la dimerización de los receptores, producen cambios en su conformación

que activan la actividad quinasa. La actividad de una subunidad del dímero fosforila a la otra subunidad del dímero en los residuos tirosina, un proceso denominado autofosforilación. La fosforilación se puede hacer en más de un sitio, pudiendo cada uno activar una vía diferente. La consecuencia de la fosforilación del receptor es por un lado, el incremento de la actividad catalítica intrínseca del receptor y por el otro, la creación de sitios de unión para reclutar proteínas de la cadena descendente de señales (proteínas adaptadoras) y fosforilarlas (Figura 1.13) [83].

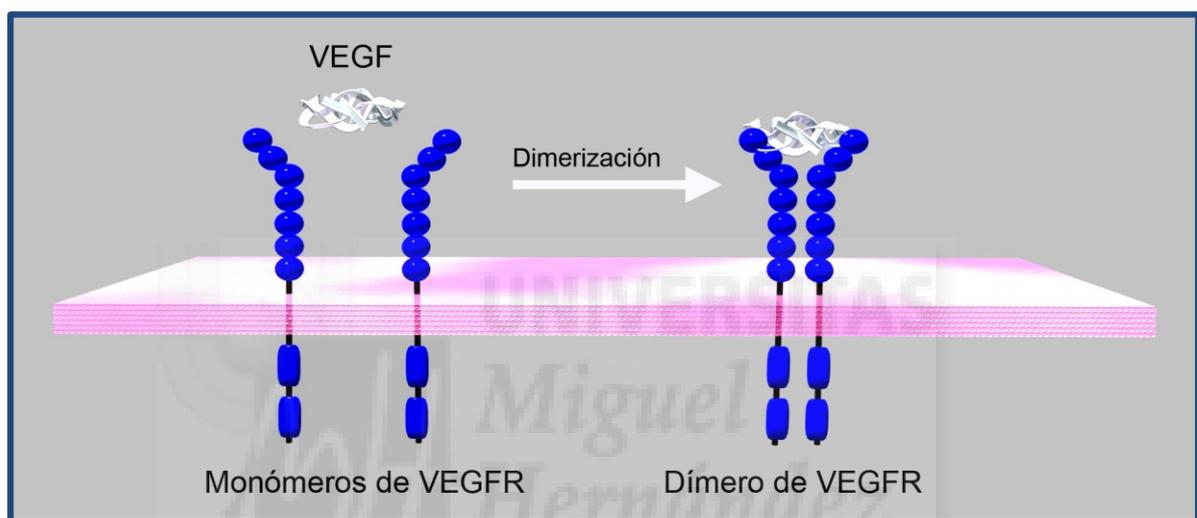


Figura 1.13. Dimerización del receptor tirosina quinasa.

Las tirosinas autofosforiladas sirven como sitios de unión de alta afinidad para numerosas proteínas intracelulares, proteínas adaptadoras, cada una de las cuales se une a diferentes sitios fosforilados del receptor activado. Los diferentes RTQs se unen a diferentes combinaciones de proteínas formando complejos que activan las distintas vías traductoras de señales. El entorno polipeptídico que rodea a una determinada tirosina fosforilada será el que confiera la unión a una u otra de estas proteínas [83].

1.3.2.3 Vías de señalización

Los receptores activados inducen la activación de múltiples vías de señalización que a su vez resultan en la expresión de genes implicados en el control de aquellos procesos celulares en los que los RTQs desempeñan un papel clave.

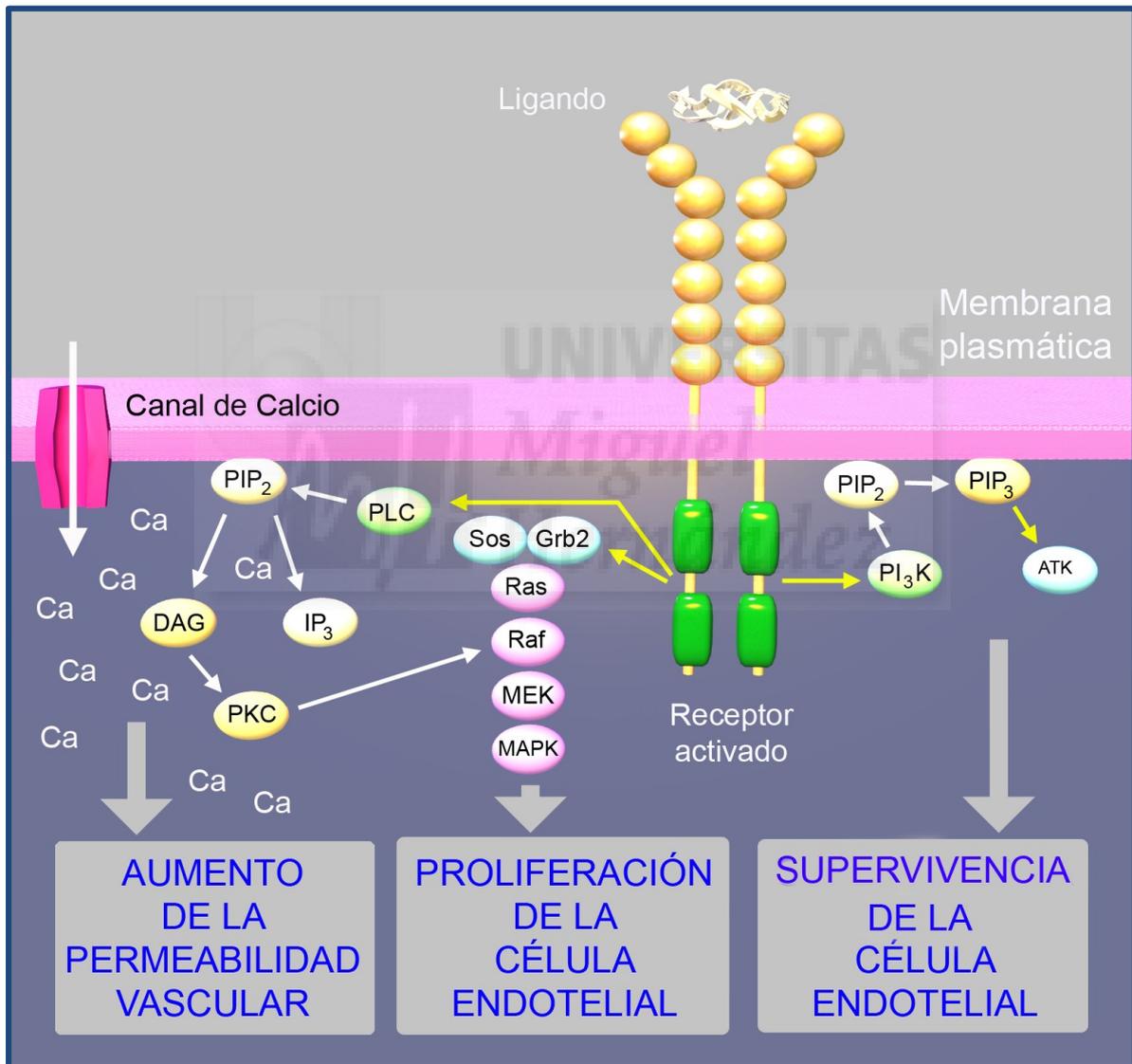


Figura 1.14. Vías de señalización de los receptores tirosina quinasa.

Entre las vías dependientes de los RTQs, las tres más relevantes son la cascada Ras-Raf-MEK-MAPK que está implicada en la regulación de la proliferación celular, la vía de señalización de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) y la vía de señalización IP₃K-Atk (Figura 1.14).

Vía de señalización Ras-Raf-MEK-MAPK

Las proteínas Ras pertenecen a una superfamilia de GTPasas monoméricas. La activación de la proteína Ras, unida al receptor tirosina quinasa activado por medio de una proteína adaptadora se inicia por la activación de una serie de eventos que se producen en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Las proteínas Ras intervienen en la transducción de señales a través de múltiples vías en el interior de la célula que determinan procesos como la proliferación y/o la diferenciación celular a partir de la activación de los receptores RTK [81, 83].

Las proteínas Ras oscilan entre dos estados conformacionales diferenciados al igual que la mayoría de proteínas que unen GTP (proteínas G): la forma inactiva unida a GDP y la forma activa unida a GTP. El ciclo de activación-inactivación produce un cambio conformacional, sirviendo Ras como un conmutador o interruptor bimodal [83].

Ras en su conformación unida a GTP se une a **proteínas efectoras** activándolas. El efector mejor caracterizado es la serina-treonina quinasa **Raf1** de la familia Raf que activa la cascada de quinasas MAP a otra quinasa celular denominada MEK (MAPKK). En células no estimuladas MEK se encuentra unida a la enzima ERK reteniéndola en el citoplasma y evitando su acumulación en el núcleo. Con los estímulos mitogénicos que fosforilan y activan MEK, el complejo MEK-ERK se disocia y el MEK activado fosforila residuos de tirosina y treonina de la quinasa MAPK/ERK transformándola en una forma activa. MAPK/ERK forma dímeros que migran al núcleo y catalizan la fosforilación de sus sustratos. En el núcleo, fosforilan factores de transcripción que resulta en la inducción rápida de genes de respuesta inmediata aumentando la síntesis de proteínas y modulando la actividad de numerosas enzimas y proteínas. Esta serie de fosforilaciones se denomina la cascada quinasa y resulta en una amplificación de la señal. Todas estas quinasas son inactivadas mediante la defosforilación de uno de los dos residuos fosforilados. Los mecanismos de inactivación se inician directa o indirectamente

cuando la vía Ras-Raf-MEK-MAPK se activa constituyendo por tanto un mecanismo de retroalimentación negativa de la propia cascada de señalización [81, 83, 85].

Los estímulos de las vías de señalización pueden generar diferentes respuestas dependiendo de su intensidad y duración. Un aspecto importante es que las vías de transducción de señales convergen y divergen permitiendo que respuestas diferentes pero superponibles sean activadas en diferentes circunstancias. La activación de la vía Ras-MAPK MEK es un punto de convergencia que puede estimularse a través de los receptores tirosina quinasa, o bien, mediante las proteínas G produciendo funciones análogas en vías paralelas. La presencia de múltiples vías con componentes análogos es común. Cada vía funciona de una manera lineal pero también puede haber entrecruzamientos entre vías. Sin embargo, por lo general, estas señales laterales son más débiles [83].

Vía de señalización de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ)

Muchas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento ejercen sus efectos fisiológicos activando isoenzimas de la fosfolipasa C (PLC). Más de 25 receptores de la superficie celular utilizan la transducción de señal por esta vía [86].

La fosfolipasa C pertenece a un grupo de enzimas que activadas por receptores, hidrolizan el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para generar inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG) (Figura 1.14) [87].

La vía que activa la PLC mediada por receptores tirosina quinasa requiere un consumo de energía derivado de ATP. Los factores de crecimiento producen la fosforilación de los residuos específicos de los dominios citoplasmáticos de los receptores tirosina quinasa [86]. Estos residuos de fosfotirosina son reconocidos por los dominios de la PLC- γ . Después de la fosforilación de PLC- γ , ésta es liberada del receptor experimentando un cambio conformacional que permite que el dominio SH3 se una a PIP₃ para originar IP₃ y DAG [86]. IP₃ deja la membrana plasmática y se une a los receptores de depósitos intracelulares / retículo endoplasmático, liberando el Ca²⁺ almacenado e incrementando su concentración citosólica. El Ca²⁺ actúa como un segundo mensajero que activa numerosas funciones. El DAG media la activación de la proteína quinasa C (PKC). PKC forma parte

de una familia de proteínas quinasas, activadas por Ca^{2+} y/o fosfolípidos, que fosforila específicamente aminoácidos de serina y treonina de una gran variedad de proteínas [86]. La PCK media la activación de la ruta de la proteína quinasa de activación mitogénica (MAPK) y estimula la síntesis de ADN y la proliferación de células endoteliales [88].

El DAG también estimula el influjo de calcio a través de los canales receptores transitorios de potencial (“*TRP channels*”) que presenta una selectividad reducida a los cationes [89].

Vía de señalización PI_3K -Akt

La fosfatidilinositol quinasa (PI_3K) pertenece a una familia de enzimas que catalizan la fosforilación del fosfolípido fosfatidil inositol difosfato (PIP_2), para formar fosfatidil inositol trifosfato (PIP_3). El PIP_3 interactúa con numerosas proteínas una de las cuales es la proteína Akt o proteína quinasa B (PKB). La Akt/PKB es una proteína serina-treonina quinasa similar a PKC. La Akt/PKB es reclutada desde el citoplasma y activada a nivel de la membrana citoplasmática por PIP_3 a la que se une experimentando un cambio conformacional. Esta translocación acerca a la Akt/PKB a otras quinasas unidas a la membrana, que la fosforilan, activándola. Estas quinasas activadoras son a su vez activadas por PIP_3 . El Akt/PKB activado mediante fosforilación actúa sobre numerosos objetivos como la síntesis de proteínas, crecimiento y supervivencia celular, transcripción y angiogénesis (Figura 1.14) [82, 90, 91].

1.3.3. Ligandos de los receptores tirosina quinasa

1.3.3.1. El factor de crecimiento endotelial vascular

Teniendo en cuenta la complejidad de un proceso como es la angiogénesis, es importante destacar que un simple factor como es VEGF lo regula predominantemente [92]. VEGF (también conocido como VEGF-A), mediante la unión a su receptor conduce a muchas respuestas celulares que incluyen la migración celular, la proliferación, la supervivencia y un incremento de la permeabilidad celular [93].

Estructura y tipos de VEGF

FAMILIA DE VEGF	RECEPTORES	FUNCIONES
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1, VEGFR-2, Nrp-1	Angiogénesis Mantenimiento vascular
VEGF-B	VEGFR-1	Angiogénesis en tejido cardiaco Supervivencia neuronal Metabolismo
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	Linfangiogénesis Vasculogénesis
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	Linfangiogénesis
Factor de crecimiento placentario (PlGF)	VEGFR-1, Nrp-1	Angiogénesis Inflamación
VEGF-E (Factor viral)	VEGFR-2	Angiogénesis

Tabla 1.5. Miembros de la familia del VEGF y sus funciones; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular; Nrp: Neuropilina.

El VEGF pertenece a una familia de 6 proteínas estructuralmente relacionadas que se caracterizan por la presencia de 8 residuos de cisteína (Tabla 1.5) [94].

VEGF-A es considerado el miembro más importante de la familia VEGF. Mediante empalme alternativo del pre-ARNm (*splicing*), procedente del único gen de VEGF-A localizado en el cromosoma 6p12-p21, se generan sus cuatro isoformas moleculares principales, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, que contienen respectivamente 121, 165, 189 y 206 aminoácidos (Figura 1.15) [95].

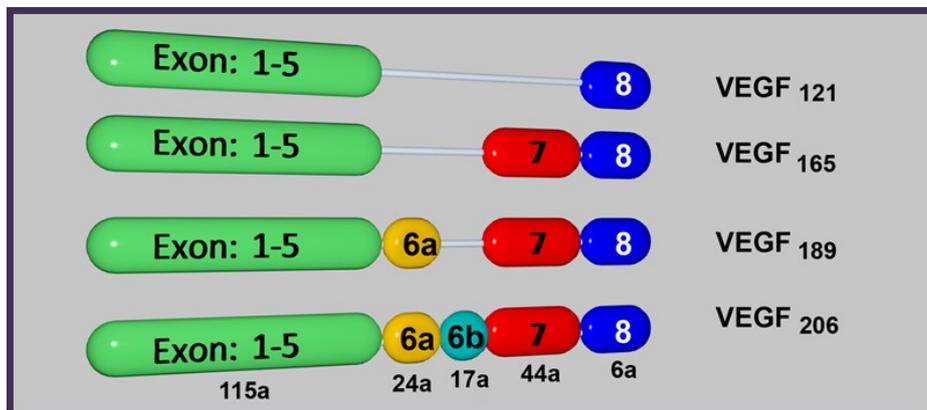


Figura 1.15. Exones codificantes de los aminoácidos de las distintas isoformas peptídicas generados por empalme alternativo (*splicing*).

Los exones del 1 al 5 son comunes en todas las isoformas de VEGF-A. No obstante, las isoformas difieren por la presencia o ausencia de aquellas secuencias que contienen dominios de unión a la heparina codificados por los exones 6 y 7 [96].

La presencia o ausencia de las secuencias de aminoácidos codificadas por los exones 6 y 7 de cada isoforma del VEGF-A determina la capacidad o no de unión a moléculas tipo heparina. La heparina y el heparán sulfato presente en la matriz extracelular y en la superficie celular juegan un papel muy importante en la angiogénesis puesto que modulan la unión entre VEGF y sus receptores condicionando sus distintas actividades biológicas [97]. VEGF-A, ligado a la matriz extracelular, constituye un reservorio que puede liberarse favoreciendo la interacción célula-célula y dirigiendo la angiogénesis en el sentido adecuado. Enzimas como la plasmina, heparinasa, uroquinasas y metaloproteinasas pueden liberar fragmentos bioactivos. Así pues, las células endoteliales pueden ser estimuladas por isoformas solubles del VEGF o por fragmentos bioactivos obtenidos de la escisión proteolítica del VEGF unido a la matriz extracelular [98].

La isoforma angiogénica predominantemente secretada es VEGF₁₆₅ [99]. El VEGF₁₆₅ es una glicoproteína de unos 45 KDa homodimérica, básica y ligadora de heparina, formada por polipéptidos con extremo aminoterminal idénticos unidos por puentes disulfuro. Los monómeros se asocian de forma antiparalela para formar el homodímero que constituye la forma activa del factor (Figura 1.16) [100].

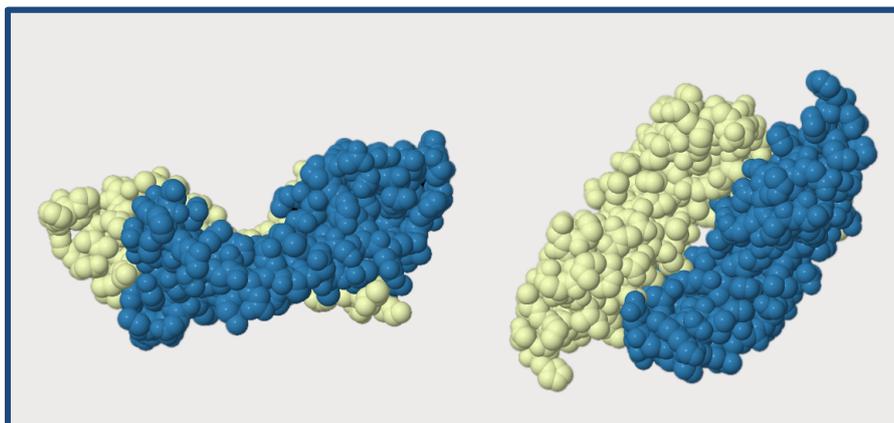


Figura 1.16. Estructura del VEGF humano. Extraído de Protein Data Bank (<http://www.rcbs.org>). Creado por Muller, Y.A y De Vos, A.M. Id: 1VPF. Jmol: visor de Java de código abierto para estructuras químicas en 3 dimensiones (<http://www.jmol.org>).

Originariamente, descubierto como un homólogo de VEGF, el factor de crecimiento placentario (PlGF) es un factor angiogénico solamente relevante en situaciones patológicas, siendo dispensable durante el desarrollo [101]. Actúa como una citoquina multifuncional que estimula la angiogénesis por mecanismos directos e indirectos [92].

La actividad angiogénica del VEGF-B está restringida solamente a algunos tejidos como el corazón, sin embargo, promueve la supervivencia neuronal e induce efectos metabólicos [101, 102].

VEGF-C y -D promueven la linfangiogénesis [103, 104]. VEGF-C funciona como quimioatrayente de células inflamatorias (ej. macrófagos) que producen de forma adicional factores proangiogénicos [105].

El VEGF-E está constituido por un grupo de proteínas codificadas por ciertas cepas de poxvirus Orf que presentan una homología significativa con VEGF y que posiblemente se haya adquirido filogenéticamente a partir de algún huésped [106].

Receptores de VEGF (VEGFR)

Algunos homodímeros como VEGF producen el simple mecanismo de la dimerización del receptor inducida por ligando. Existen tres receptores primarios del VEGF (VEGFR-1 o Flt-1, VEGFR-2 o Flk-1/KDR y VEGFR-3 o Flt-4) y dos correceptores (neuropilina 1 y - 2). VEGFR-1 y VEGFR-2 se asocian principalmente a la angiogénesis, mientras que el VEGFR-3, se relaciona con la linfangiogénesis [93].

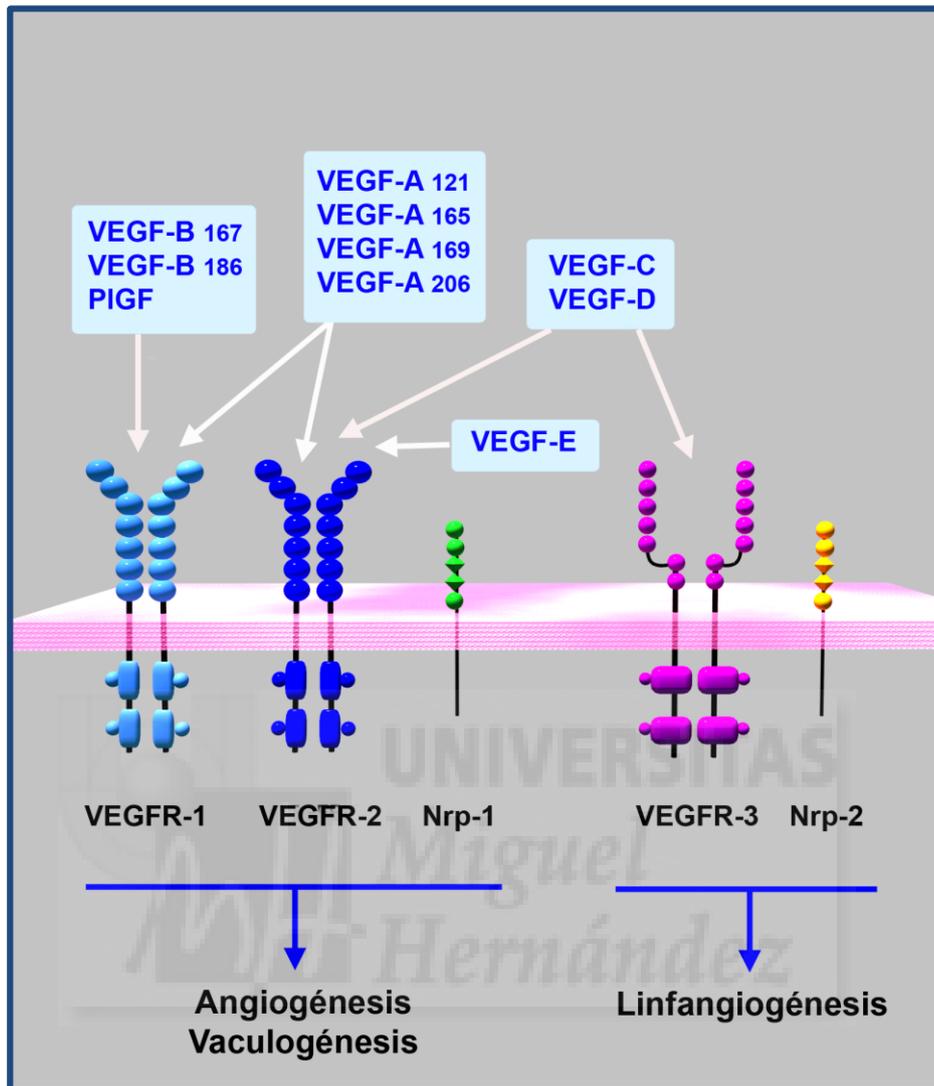


Figura 1.17. Especificidades ligando-receptor y efectos biológicos de la activación del receptor.

Los receptores primarios están constituidos por una cadena peptídica que podemos dividir en tres porciones: una región extracelular que contiene siete dominios tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y una secuencia citoplasmática con actividad tirosina quinasa (Figura 1.17) [107].

Las neuropilinas (Nrp-1 y -2) son correceptores de VEGF, que potencian la actividad de VEGFR-2, aunque también producen señales de forma independiente [92].

El VEGFR-2 es el principal mediador de los efectos que ejerce el VEGF sobre la mitogénesis, la angiogénesis y la potenciación de la permeabilidad vascular [93]. La expresión de VEGFR-2 juega un papel crucial en la diferenciación endotelial celular, de hecho, altos niveles de ARNm de la proteína de VEGFR-2 se encuentran en las células endoteliales punta [108].

En respuesta al gradiente de VEGF, establecido por las isoformas solubles y las unidas a la matriz extracelular, las células punta del endotelio vascular, sobrerregulan la expresión de DLL4, haciendo que las células vecinas respondan menos a VEGF, asegurando que las células punta tomen la iniciativa [61]. Las isoformas de VEGF solubles promueven el alargamiento del vaso, mientras que las isoformas ligadas a la matriz estimulan la ramificación [92].

Además, las células punta y sus filopodias también expresan VEGFR-3. La activación de VEGFR-3 por su ligando VEGF-C permite el crecimiento de los vasos sanguíneos incluso en ausencia de la señal VEGF-A / VEGFR-2 [109].

El papel preciso del VEGFR-1 en la angiogénesis todavía es desconocido. Debido a su débil actividad quinasa, VEGFR-1 se piensa que actúa como un receptor señuelo secuestrando el VEGF para evitar que se una al VEGFR-2.

Los complejos de señalización VEGF/VEGFR también incluyen correceptores como la neuropilina (Nrp-1 y -2). Un correceptor es un receptor de la superficie celular que se une a una molécula de señalización en adición al receptor primario, facilitando el reconocimiento del ligando e incluyendo señales celulares específicas internas. La formación de complejos VEGFR-2/Nrp amplifica la señal de la angiogénesis inducida por VEGF [110].

Otro correceptor de la señalización de VEGF en la inducción de la célula punta es la ephrina-B2 (EFNB2), un ligando transmembrana para el receptor tirosina quinasa EphB [111]. EFNB2 controla la internalización del VEGFR2, el cual es necesario para la cascada de señalización del receptor y es requerido para la extensión de las filopodias de las células punta inducida por VEGF [112].

VEGF-C, un ligando de VEGFR-2 y -3, también activa las células punta del endotelio vascular [113]. VEGFR-3 es necesario para la formación de los vasos sanguíneos durante la embriogénesis temprana, pero posteriormente se convierte en un regulador clave de la linfangiogénesis [114]. Cuando los ligandos VEGF-C y

-D se unen al VEGFR-3 se desencadena la proliferación, la migración y la supervivencia de las células endoteliales linfáticas [93].

Actividades biológicas de VEGF-A

La inflamación y la hipoxia inducen la producción de VEGF-A mediante una variedad de tipos celulares, entre los que se incluyen vasos sanguíneos asociados a pericitos, células musculares lisas y macrófagos asociados a la inflamación. Las funciones biológicas de VEGF-A se exponen en la Tabla 1.6 [51, 115].

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE VEGF
Permeabilidad vascular
Vasodilatación
Remodelamiento tisular e invasión celular
Proliferación y migración
Supervivencia
Vasculogénesis y hematopoyesis

Tabla 1.6. Resumen de las funciones del VEGF en las células endoteliales.

- a) **Permeabilidad vascular:** VEGF produce un incremento en la conductividad hidráulica de microvasos, un efecto mediado por el incremento del influjo de calcio [89] e induce la formación de fenestraciones en las células endoteliales. Así pues, una de las funciones principales de VEGF en el proceso angiogénico es favorecer la fuga de plasma proteico. El resultado es la formación de un gel extravascular de fibrina que constituye el substrato para el crecimiento de las células endoteliales vasculares [116].
- b) **Remodelamiento tisular e invasión celular:** VEGF funciona como una citoquina multifuncional que modifica la matriz extracelular promoviendo la extravasación de plasma con la resultante aparición de fibrina [117]. VEGF induce la expresión de los activadores del plasminógeno tisular y uroquinasa (serinas proteasas) y también del inhibidor del plasminógeno (PAI-1), siendo necesario un equilibrio entre la proteólisis celular y los inhibidores de las proteasas para una morfogénesis capilar normal [77, 118].

- c) **Proliferación y migración de las células endoteliales:** Las células punta, las células tallo y las células falanges son dependientes del ligamiento de VEGF a los receptores de membrana. Una primera explicación se basa en que las concentraciones de VEGF-A varían según el área de los tejidos angiogénicos y las células endoteliales se convierten en células punta y permanecen en este fenotipo si los niveles de VEGF-A han alcanzado unos niveles altos. Es interesante señalar que los tres fenotipos reaccionan en distintas vías para la señalización de VEGF: las células punta empiezan a migrar y extender filopodias, las células tallo empiezan a proliferar y las células falange necesitan niveles bajos de VEGF-A para su supervivencia [119].
- d) **Supervivencia:** VEGF previene de la apoptosis endotelial a través de la vía del PI₃K-Atk [120]. Por otro lado, incrementa la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, A1, XIAP y survivina) [93]. La dependencia de VEGF para la supervivencia se produce en los vasos recién formados, pero no en los ya establecidos. Esa pérdida de esta dependencia en los vasos maduros se ha atribuido al recubrimiento por los pericitos [121].
- e) **Vasculogénesis y hematopoyesis:** VEGF es crítico para la generación de los vasos durante la embriogénesis y la hematopoyesis a través de los receptores VEGFR-1 y -2 [122]. En células de la médula ósea se ha observado que VEGF induce la quimiotaxis de los monocitos, inhibe la maduración de las células dendríticas, de la producción de células B y genera células mieloides inmaduras [93].

VEGF y las enfermedades del ojo

En el ojo, VEGF estimula el crecimiento vascular en los tejidos isquémicos pero, sin embargo, a menudo, los neovasos van asociados con extravasaciones indeseables y anomalías vasculares [92].

Existe una estrecha correlación entre las concentraciones de VEGF y la retinopatía activa secundaria a la diabetes, la oclusión de la vena central de la retina, la retinopatía de la prematuridad y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) exudativa [123, 124]. Además, los estudios sostienen que VEGF es el mediador más importante en la NVC.

En la córnea, VEGF se expresa en las tres capas celulares: epitelio, estroma y endotelio. Sin embargo, la córnea se mantiene avascular incluso cuando niveles significativos de VEGF se están expresando, particularmente en las células epiteliales. Una explicación es que la respuesta angiogénica depende del balance de la producción de reguladores positivos de la angiogénesis y de los inhibidores de la angiogénesis, siendo estos últimos los que bloquean la respuesta angiogénica en las córneas normales. En córneas normales, VEGF se expresa de forma elevada en las células endoteliales de los vasos limbares y, de forma tenue, en los queratocitos. En córneas inflamadas, la expresión de VEGF está aumentada en las células del epitelio corneal y en las células endoteliales vasculares, sobre todo cerca de los infiltrados macrofágicos y los fibroblastos del tejido cicatrizal [125].

1.3.3.2. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

En los años setenta, los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) fueron purificados desde los extractos de plaquetas y caracterizados como mitógenos para los fibroblastos y células de origen mesenquimal. En la actualidad, se sabe que los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs) participan en una diversidad de procesos biológicos, que incluyen la linfangiogénesis y el remodelado tisular [126].

Para una correcta maduración, los vasos sanguíneos deben ser cubiertos por células murales (pericitos y células musculares lisas). La vía de señalización del PDGF juega un papel crucial en mantener la integridad de los vasos. Además existen otras familias de factores de crecimiento como las angiopoyetinas y TGF- β que contribuyen a este proceso [76].

Estructura y tipos de PDGF

PDGF es una familia de proteínas multifuncionales diméricas unidas por puentes disulfuro (Figura 1.18) [127]. Se conocen cuatro cadenas polipeptídicas -A, -B, -C y -D. La mayoría de los tipos celulares expresan las cadenas A y B que forman homodímeros (PDGF-AA y -BB) o heterodímeros (PDGF-AB). La presencia de homodímeros es dominante, al menos durante el desarrollo. PDGF-AB parece

estar dotado de propiedades de señalización distintas de las formas homodiméricas, pero su importancia fisiológica se desconoce [128]. Las cadenas polipeptídicas -C y -D solo forman homodímeros (PDGF-CC y -DD).

PDGF-B se expresa principalmente en las células endoteliales vasculares, megacariocitos y neuronas; PDGF-C se expresa en las células epiteliales, el músculo y los progenitores neuronales. La expresión de PDGF-D está menos caracterizada, pero ha sido observada en células musculares lisas de otras localizaciones [128].

Las CEV secretan PDGF-B y los pericitos expresan el receptor- β (PDGF- β), sugiriendo un modo de interacción paracrina entre los dos tipos de células. Así pues, las células endoteliales angiogénicas liberan PDGF-B estimulando a los pericitos para la maduración y estabilización del vaso [129]. De hecho, en estudios experimentales, la deficiencia de pericitos causa extravasación, tortuosidad, formación de microaneurismas y sangrado [130].

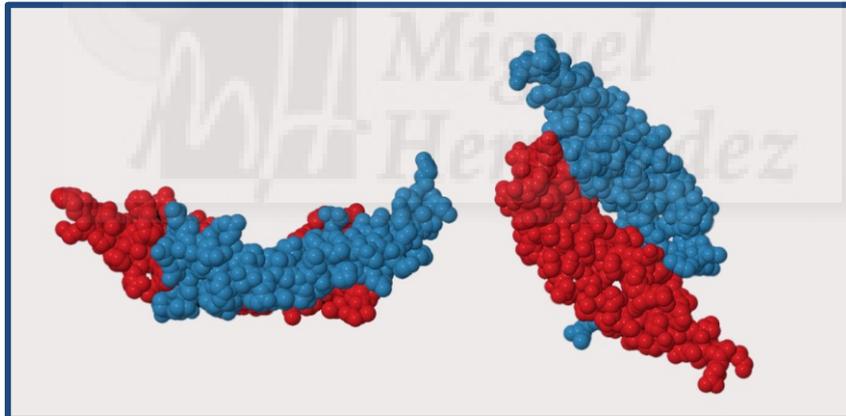


Figura 1.18. Estructura de PDGF-BB humano. Extraído de Protein Data Bank (<http://www.rcbs.org>). Creado por Oefner, C.; Darcy, A.D.; Winkler, F.K.; Eggimann, B. y Hosnag, M., Id: 1PDG. Jmol: visor de Java de código abierto para estructuras químicas en 3 dimensiones (<http://www.jmol.org>).

Receptores de PDGF (PDGFR)

Las isoformas de PDGF ejercen sus efectos en las células a través de dos receptores con actividad tirosina quinasa: α y β . Los dos receptores de PDGF com-

parten una estructura común: región extracelular con 5 dominios tipo inmunoglobulina, un dominio transmembránico y un dominio tirosina quinasa intracelular, el cual está dividido en dos porciones conectadas por un polipéptido flexible [131].

El dímero del receptor del PDGF se forma después de la unión al ligando, de modo que, la composición del receptor depende de la isoforma de PDGF que esté presente. Los receptores se pueden combinar para generar homodímeros o heterodímeros, dando como resultado tres posibles combinaciones, PDGFR- $\alpha\alpha$, - $\alpha\beta$ y - $\beta\beta$ [128].

Actividades biológicas de PDGF

Las isoformas de PDGF estimulan el crecimiento, la supervivencia y la motilidad de las células mesenquimales. Realizan importantes funciones durante el desarrollo embrionario y también participan en el control de la homeostasis de los tejidos en el adulto [132].

Estudios sobre los PDGF y sus receptores han revelado papeles importantes en el desarrollo de la cresta neural craneal y cardíaca, las gónadas, los pulmones, el intestino, la piel, el sistema nervioso central y el esqueleto [128]. De hecho, en ratones, la disrupción en cualquier fase del desarrollo de un simple ligando o receptor es letal, excepto con el PDGF-D [131].

Se ha sugerido un papel central de PDGFR- α en la señalización de varios tipos de patologías conducidas por los fibroblastos o células mesenquimales. Igualmente, se han establecido papeles para la señalización PDGFR- β en la formación de vasos sanguíneos y la hematopoyesis temprana [128].

El recubrimiento por los pericitos del vaso sanguíneo recién formado está regulado por PDGF-BB y las señales de PDGFR- β . Las células endoteliales nacientes de los brotes vasculares producen PDGF-B y generan un gradiente de concentración que promueve el reclutamiento de pericitos que expresan el receptor de PDGF [133]. Una deficiencia de PDGF-BB o PDGFR- β da lugar a fatales anomalías cardiovasculares y hematológicas [134, 135].

Por otro lado, VEGF mediante la activación de VEGFR-2 suprime la señal de PDGFR- β , a través de la inducción de un complejo VEGFR-2/PDGFR- β [136]. La inhibición de PDGFR- β conduce a la pérdida de pericitos adheridos a los vasos

y disminuye la densidad de los mismos y su estabilidad [137]. Así pues, en condiciones de angiogénesis VEGF abole el recubrimiento de los pericitos permitiendo la desestabilización vascular.

PDGF y las enfermedades del ojo

Los PDGFs juegan un papel clave en la patogenia de la orbitopatía tiroidea. La activación de los fibroblastos de la órbita son el principal determinante de la inflamación y expansión del tejido orbitario. PDGF-BB exhibe una activación intensa de los fibroblastos, estimulando la proliferación de los mismos, la excesiva producción de citoquinas y hialuronato, y la diferenciación en adipocitos. Además, incrementa el receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR) [138].

Los pericitos expresan PDGFR- β , permitiendo que PDGF-BB juegue un papel importante en el mantenimiento de la vascularización retiniana. De hecho, se ha descrito la aparición de una retinopatía vascular focal acompañada de una pérdida de pericitos retinianos en ratones con una deficiencia de PDGF-B [139, 140].

En ratones, una excesiva señalización de PDGF-BB se asocia a enfermedades retinianas proliferativas que resulta en una formación anormal de los vasos retinianos [141]. Por otro lado, el receptor PDGFR- α está implicado en la vitreoretinopatía proliferativa, la complicación más seria en pacientes intervenidos quirúrgicamente de desprendimiento de retina. Sin embargo, las isoformas de PDGF no parecen responsables de esta activación de PDGFR- α . Predomina un mecanismo indirecto por el cual factores de crecimiento vítreos que no pertenecen a la familia PDGF promueven una ruta intracelular para activar al receptor [142].

PDGF-A se expresa en las neuronas y astrocitos y junto a PDGFR- α , es responsable del reclutamiento y subsecuente desarrollo de los precursores de los astrocitos en la retina [143]. En un modelo experimental de glaucoma, se ha demostrado que PDGF promueve la supervivencia de las neuronas, el incremento de células gliales y poblaciones de macrófagos derivados de los monocitos y protege las sinapsis intrarretinianas [144].

En la córnea, PDGF-A y -B se detecta en las células epiteliales corneales, fibroblastos del estroma, y células endoteliales, y PDGF-BB se puede aislar en la lágrima [145]. En cuanto a la NVC, el bloqueo de las vías de señalización del

PDGF-B interrumpe las interacciones entre las células endoteliales y los pericitos, produciendo la consecuente pérdida de células murales y una reducción de la densidad de los neovasos corneales [137].

1.3.3.3. El factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Estructura y tipos de FGF

La superfamilia de los FGFs y sus receptores controlan un extenso rango de funciones biológicas cuyos miembros presentan una estructura tridimensional en forma de trébol- β (Figura 1.19) [146, 147]. Los FGF pertenecen a una familia constituida por 23 péptidos que se ligan a la heparina, estructuralmente relacionados, que son ampliamente expresados durante el desarrollo y en los tejidos adultos durante la diferenciación celular, angiogénesis, mitogénesis y reparación de las heridas.

Los dos factores de crecimiento fibroblásticos que han sido más ampliamente estudiados son el FGF-1 y -2 y su función está mediada por la unión a sus receptores correspondientes [20].

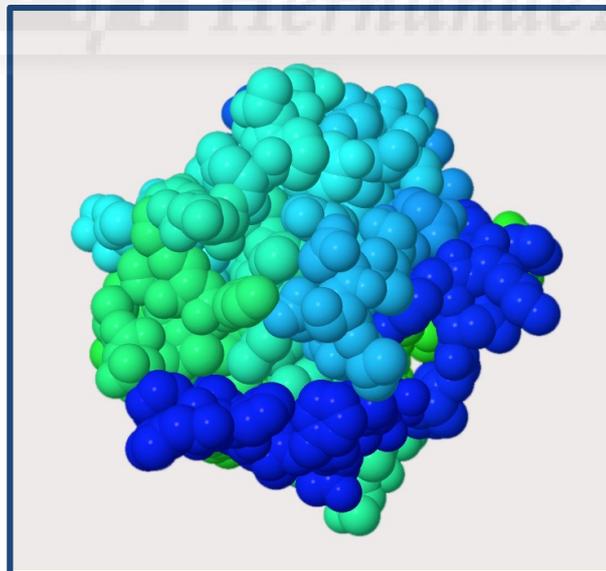


Figura 1.19. Estructura del factor de crecimiento fibroblástico ácido humano (FGF-1). Extraído de Protein Data Bank (<http://www.rcbs.org>). Creado por Bennett, M.J.; Somasundaram, T. y Blaber, M. Id: 1RG8. Jmol: visor de Java de código abierto para estructuras químicas en 3 dimensiones (<http://www.jmol.org>).

Receptores de FGF (FGFR)

FGFs activan los receptores FGFRs de las células endoteliales o indirectamente estimulan la angiogénesis induciendo la liberación de factores angiogénicos de otros tipos celulares [148]. La familia de los receptores FGFRs está constituida por 4 miembros (FGFR-1, -2, -3 y -4). Los diferentes ligandos del FGF con sus distintas afinidades hacia los receptores generan complejas interacciones específicas sobre una gran variedad de tipos celulares. Esta complejidad aumenta adicionalmente con los requerimientos de la heparina sulfato y del heparán sulfato de la superficie celular que son necesarios para que los FGFs activen sus receptores [149].

Los FGF-1 y 2 secretados se ligan al heparán sulfato de los proteoglicanos de la matriz [147]. Esta unión resalta el papel de la matriz extracelular en la regulación de la angiogénesis corneal. Así pues, la biosíntesis de heparán sulfato en la matriz extracelular de diferentes tejidos puede proveer un andamio en el cual las células que expresen FGF puedan migrar y donde esas células puedan sobrevivir, proliferar y posteriormente diferenciarse [82].

La activación del receptor en la superficie celular está mediada por un complejo ternario formado por ligandos idénticos del FGF, dos subunidades idénticas del FGFR y una o dos cadenas de heparán sulfato de la superficie celular. La dimerización de los FGFR produce autofosforilación y desencadena el reclutamiento de proteínas de señal intracelulares [146].

FGF-1 y -2, además de inducir la señal de transducción a través de los receptores específicos, pueden internalizarse en asociación con el heparán sulfato o con su receptor específico sin que implique su activación, siendo posteriormente procesados para el desarrollo de su actividad [150].

Actividades biológicas de FGF

Los FGFs ejercen diversos roles durante el desarrollo embriológico regulando la proliferación celular, la migración y la diferenciación. Los FGFs son factores homeostáticos y actúan en la reparación de los tejidos [151]. Sin embargo, ni

FGF-1 ni -2 se requieren para el crecimiento normal, el desarrollo o la fertilidad [148, 152].

FGF-1 y -2 promueven el crecimiento de los nuevos vasos a partir de la vascularización preexistente [151]. FGF-2, también conocido como FGF básico (bFGF), estimula la migración vascular de las células endoteliales, la proliferación, y la diferenciación e inhibe la apoptosis celular [153]. FGF también es necesario para mantener la integridad vascular. De hecho, la inhibición de la señal de FGFR en las células endoteliales quiescentes causa la desintegración del vaso sanguíneo, sugiriendo que las señales mediadas por FGF regulan la permeabilidad vascular [154]. Además, cuando FGF-2 está presente se incrementa sinérgicamente la actividad angiogénica de VEGF [155].

FGF y las enfermedades del ojo

FGF-2 (b-FGF) ha sido detectado en membranas neovasculares y epirretinianas humanas [156]. Además, FGF-2 podría contribuir a la inflamación orbitaria y al remodelamiento tisular de la orbitopatía tiroidea, especialmente a través de una interacción sinérgica con PDGF-BB [138].

FGF-1 y -2 juegan un papel importante en la curación de las heridas incluyendo las lesiones corneales. Estimulan la formación del tejido de granulación y la reepitelización, procesos caracterizados por la migración de macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos en el tejido dañado [157]. FGF-2 se sintetiza por parte de las células del epitelio corneal y se libera pasivamente en respuesta a una lesión de las células epiteliales [15]. Una vez que es liberado, FGF-2 se une a los polisacáridos de heparán sulfato expresados en las membranas (membrana de Descemet, membrana de Bowman, membrana basal vascular) [148, 158].

1.3.3.4. Angiopoyetinas (Ang)

Los vasos sanguíneos normales deben estar equipados con mecanismos para mantener su quiescencia y, a su vez, la capacidad para responder al estímulo angiogénico. La familia de angiopoyetinas (Ang) y sus receptores (Tie) constituyen un sistema binario para ofrecer tal cambio (quiescencia / angiogénesis).

Estructura y tipos de angiopoyetinas

La familia Ang humana tiene dos receptores, Tie-1 y Tie-2, y cuatro ligandos Ang-1, -2, -3 y -4 (Figura 1.20). Los ligandos mejor conocidos y caracterizados son Ang-1 y Ang-2 a través del receptor Tie-2. Ang-1 actúa como agonista de Tie-2 y Ang-2 como un competitivo antagonista de Ang-1 en una forma contexto-dependiente [159].

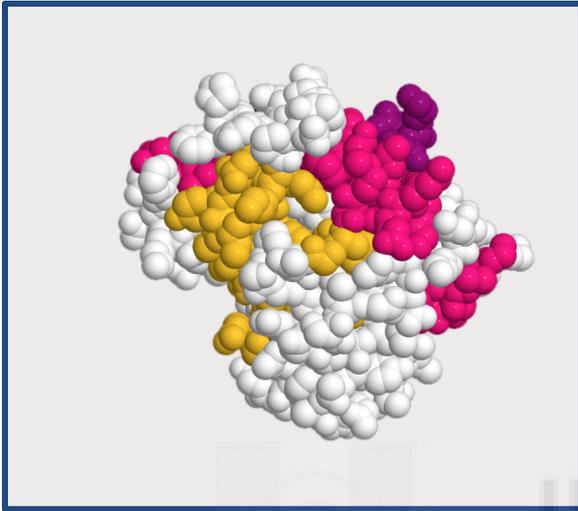


Figura 1.20. Estructura de la angiopoyetina-1. Extraído de Protein Data Bank (<http://www.rcbs.org>). Creado por YU, C.; Seegar, T.C.M.; Dalton, A.C.; Tzvetkova-Robev D.; Goldgur Y.; Nikolov D.B. y Barton, W.A. Id: 4JYO. Jmol: visor de Java de código abierto para estructuras químicas en 3 dimensiones. (<http://www.jmol.org>)

Receptores de las angiopoyetinas

El receptor de las angiopoyetinas Tie-2 se expresa de manera exclusiva en las células endoteliales y en las células progenitoras hematopoyéticas. El hecho de que las células murales no expresen Tie-2 ha llevado a la hipótesis de que las CEVs regulan el recubrimiento de las células murales (pericitos y células musculares lisas) de manera paracrina mediante la activación de Tie-2. Las CEV, por su parte, producen y secretan sustancias quimiotácticas como PDGF-BB y TGF- β , que se encargan de reclutar las células murales para estabilizar los neovasos [140, 160].

Ambos tipos de angiopoyetina (Ang-1 y Ang-2) se unen al mismo lugar del dominio extracelular de Tie-2 con similares afinidades. Cuando Ang 1 activa la Tie-2 mediante fosforilación se inician distintas cascadas de señalización celular: a) vía PI_3K -Akt, esencial para la supervivencia, migración y formación tubular; b) vía Dok-R-PAK y las GTPasas RhoA y Rac-1, relacionadas en el efecto migratorio; y c) vía Ras-Raf-1-MEK-MAPK involucrada en la proliferación de las células endoteliales [161, 162]. Sin embargo, Ang-2 se une a Tie-2 sin producir ninguna señal de transducción [163].

No se ha identificado un ligando para Tie-1 por lo que, este receptor huérfano, podría actuar como un regulador negativo de Tie-2 pero su rol exacto es incierto [159].

Actividades biológicas de las angiopoyetinas

Las angiopoyetinas regulan la angiogénesis, la extravasación vascular y la inflamación [159].

Las angiopoyetinas también controlan el reclutamiento de los pericitos. Ang-1 expresada por los pericitos se liga y activa el receptor Tie-2 de las células endoteliales, promoviendo la unión del pericito a los capilares y, de esta forma, estimulando la cobertura mural y la deposición de la membrana basal promoviendo la impermeabilidad del vaso [164] [165].

Ang-2 se expresa en las células endoteliales localizadas en el frente de los vasos proliferantes y actúa como un factor desestabilizador en áreas de remodelamiento vascular [163]. De este modo, Ang-2 antagoniza la actividad de Ang-1 induciendo la desestabilización vascular y facilitando la germinación y la ramificación [159]. Los altos niveles de VEGF y Ang-2 desestabilizan los vasos causando la proliferación celular y el desprendimiento de los pericitos, la permeabilidad y el brote de las células endoteliales, permitiendo a las células punta migrar (Figura 1.21) [159, 166].

En conformidad con lo expuesto, la deficiencia de Tie-2 en ratones causa defectos vasculares y mutaciones del receptor en humanos y resulta en malformaciones [167]. La administración exógena de la Ang-1 y Ang-2 por sí sola no induce la NVC, sin embargo, la Ang-1 y Ang-2 afectan profundamente al desarrollo de la NVC inducida por VEGF [168]. Además, Ang-2 induce la regresión de los vasos sanguíneos en ausencia de VEGF, sugiriendo que la desestabilización inducida por Ang-2 sirve como función antiangiogénica cuando no existe el estímulo angiogénico [169].

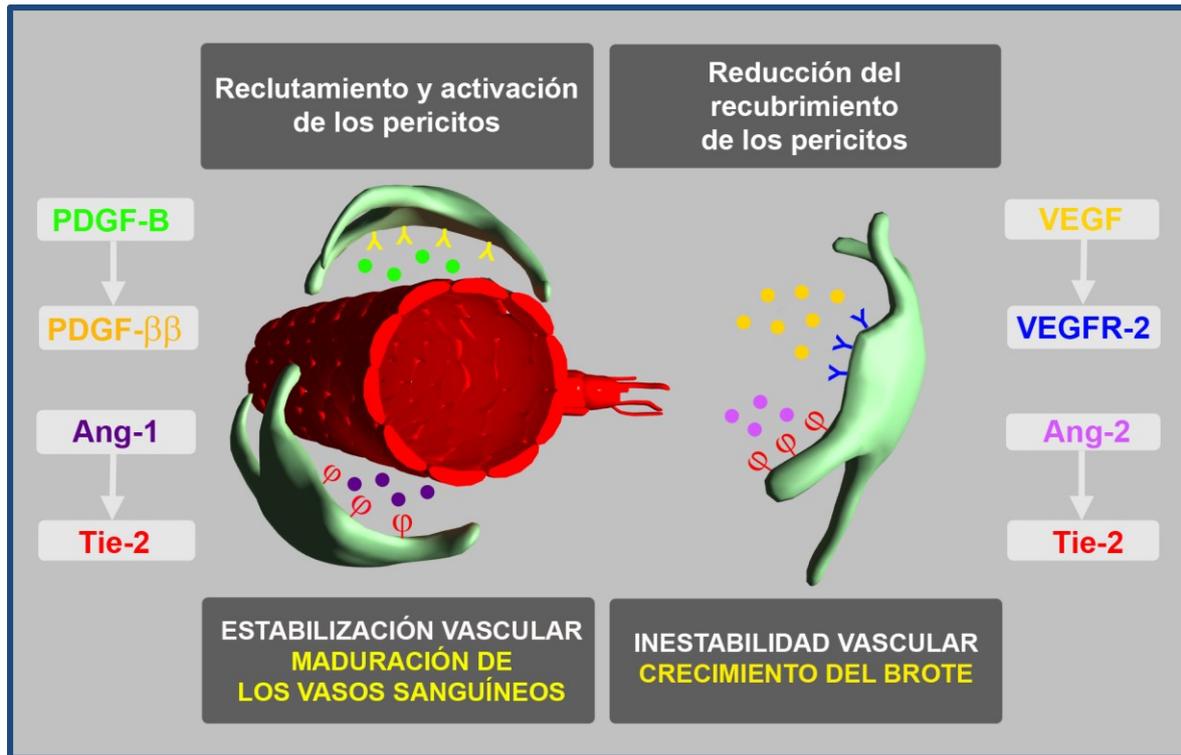


Figura 1.21. Funciones de Ang-1 y Ang-2.

Angiopoyetinas y las enfermedades del ojo

En un modelo murino de retinopatía isquémica se ha demostrado que la inducción de Ang-2 incrementa la NV retiniana cuando los niveles de VEGF están notablemente incrementados. Sin embargo, cuando los niveles de VEGF son bajos, se produce una rápida regresión de la NV retiniana. De igual modo Ang-2 estimula la NV coroidea cuando VEGF está elevado y causa una rápida regresión cuando los niveles de VEGF son bajos [170]. En contraste, la expresión de Ang-1 no es contexto dependiente y suprime siempre la neovascularización retiniana y coroidea [171]. Estas observaciones sugieren que la estimulación de Tie-2 por Ang-1 estabiliza los vasos retinianos y coroides y reduce su capacidad para producir nuevos vasos en presencia de VEGF, mientras que Ang-2 promueve la desfosforilación de Tie-2, desestabilizando los vasos y permitiendo a VEGF estimular el brote de los neovasos. El crecimiento de los neovasos es mayor en presencia de VEGF y Ang-2 que si se produce un incremento aislado de VEGF y, sin embargo, cuando los niveles de VEGF disminuyen en presencia de concentraciones altas de Ang-2 los vasos rápidamente regresan [172].

1.4. TRATAMIENTO DE LA NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL

El tratamiento de la NVC es cambiante y controvertido. Muchas opciones médicas y quirúrgicas están disponibles para el tratamiento de la NVC y se han realizado con variado grado de éxito. El abordaje terapéutico de la NVC tiene como fin lograr la antiangiogénesis o la angioregresión. La terapia antiangiogénica tiene como objeto detener la formación de nuevos vasos y es más efectiva en el curso temprano de la NVC. [49]. El objetivo de la terapia regresiva es inducir la regresión de los vasos inmaduros recién formados o los vasos antiguos establecidos [173]. Podemos clasificar las modalidades de tratamiento en médicas o quirúrgicas.

1.4.1. Tratamiento médico

En esta sección se revisa el tratamiento mediante esteroides, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), ciclosporina y agentes anti-VEGF. Además, existen otras moléculas que, mediante administración tópica, han mostrado actividad antiangiogénica en la NVC como los antagonistas del receptor de IL-1 [174], octeotride [175], fragmentos del plasminógeno [176], espironolactona [177], talidomida [178], amiloride [179], curcumina [180], aganirsén (oligonucleótido antisentido) [181], etc.

1.4.1.1. Los esteroides

En la práctica clínica diaria, los esteroides (hidrocortisona, dexametasona, prednisolona, triamcinolona) son el pilar principal para la supresión activa de los vasos corneales proliferantes. El efecto antiangiogénico de los esteroides es el resultado de sus múltiples propiedades antiinflamatorias que incluyen la inhibición de la quimiotaxis de las células, la modulación de la actividad proteolítica de las CEV, la inhibición de las citoquinas (IL-1, IL-6 y TNF- α) y del activador del plasminógeno y la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Fosfolipasa A₂) [173]. Los efectos de los esteroides son más efectivos cuando son aplicados antes o inmediatamente después del daño corneal. Sin embargo, los corticoides no producen

una supresión completa de la angiogénesis. A causa de este hecho y por los conocidos efectos secundarios (glaucoma, catarata, sobreinfecciones, recurrencia del herpes simple) se están buscando otros tratamientos más efectivos [173].

1.4.1.2. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los AINEs (flurbiprofeno, indometacina, ketorolaco, diclofenaco, nepafenaco) son otra clase de agentes antiinflamatorios que actúan sobre la síntesis de prostaglandinas (PGs). Las PGs (específicamente la PG E₂) se producen durante la inflamación corneal y la reparación de las heridas y son proangiogénicas [20, 173]. Los AINEs inhiben específicamente la enzima ciclo-oxigenasa que convierte el ácido araquidónico en PGs. Los vasos sanguíneos normales expresan la enzima COX-1 (isoforma constitutiva) y las CEv de los neovasos expresan la isoforma mitógeno-inducida COX-2 [182]. Los eicosanoides producidos por COX-2 están entre los múltiples mediadores que modulan la expresión de VEGF en la angiogénesis asociada a inflamación [183]. Desafortunadamente, la eficacia variable y los efectos adversos a veces asociados con el uso de NSAIDs tópicos (ej. ulceración corneal y perforación) han limitado su utilidad clínica, particularmente en el marco de pacientes con una enfermedad de superficie ocular concomitante [173].

1.4.1.3. La ciclosporina

La ciclosporina tiene una alta especificidad por los linfocitos-T e inhibe la respuesta inmune mediada por células, probablemente a través de la inhibición de la NVC inducida por IL-2. Este agente juega un papel en aquellas situaciones donde los esteroides deben ser reducidos. Algunos autores han descrito una mejora en la NVC asociada a inflamación [184, 185]. Sin embargo la toxicidad sistémica se opone a su uso generalizado y la presencia de depósitos corneales han sido descritos con su uso clínico [186].

1.4.1.4. Los agentes anti-VEGF

Varias estrategias terapéuticas han sido usadas para interferir con el sistema VEGF: Anticuerpos neutralizantes de VEGF, anticuerpos de los receptores

de VEGF, proteínas del receptor de VEGF soluble recombinante, nucleótidos anti-sentido de VEGF, ribozimas y receptores tirosina quinasa [173]. En la actualidad, el foco clínico para el tratamiento de la NVC está en el uso de los anticuerpos contra el VEGF.

El primer fármaco antiangiogénico moderno utilizado, off label, en el tratamiento de la NVC corneal y del que más información se dispone es Bevacizumab. **Bevacizumab** (Avastin; Genetch, Roche, Suiza) es un anticuerpo monoclonal humanizado (149 KD) que se une a las isoformas de VEGF-A. El anticuerpo se une a VEGF-A y lo desactiva, lo cual resulta en la inhibición de la formación de vasos sanguíneos anormales y disminuye la permeabilidad vascular (Figura 1.22).

En humanos, la administración tópica de bevacizumab reduce el área de vascularización corneal entre un 47% y un 61% según las series y reduce el calibre de los vasos entre un 24 y un 54% [187, 188]. Resultados similares se han obtenido con la administración subconjuntival de bevacizumab [189, 190]. En estos estudios, la neovascularización corneal no es completamente eliminada.

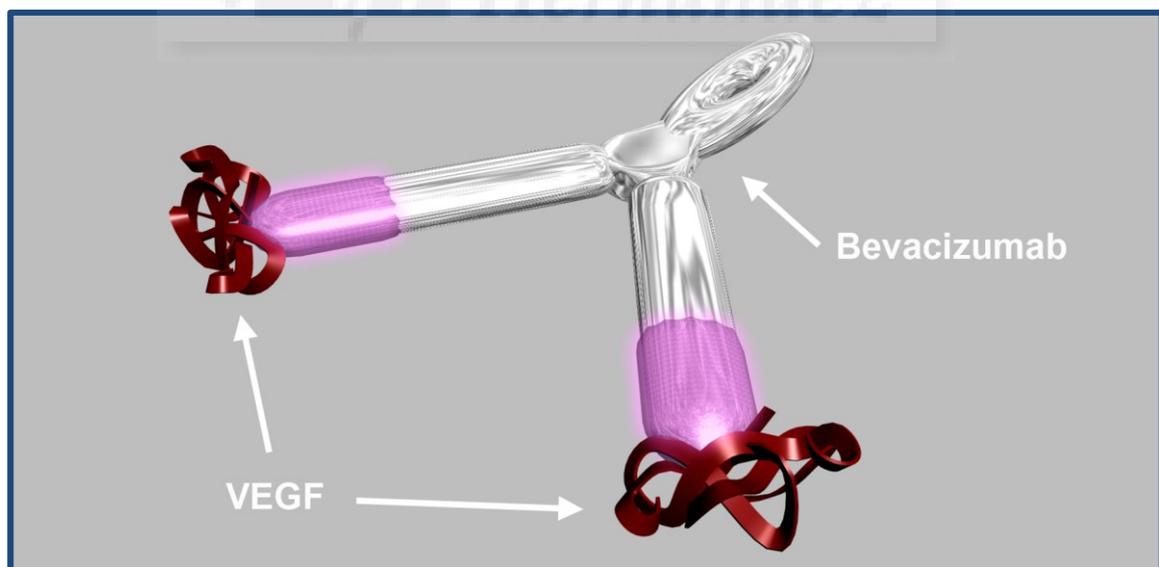


Figura 1.22. Unión de bevacizumab a dos moléculas de VEGF.

Ranibizumab (Genetech, Roche, Suiza) es un fragmento de anticuerpo humanizado (48 KD) aprobado en oftalmología para el tratamiento de la degeneración macular, las oclusiones venosas retinianas y la retinopatía diabética. Ferrari y coautores objetivaron que la administración tópica en humanos reduce el área de NVC un 55% y el calibre de los vasos un 59% sin hallar diferencias significativas con bevacizumab [191].

Aflibercept o VEGF TRAP (Bayer Pharma AG, Leverkusen, Alemania) es una proteína de fusión que consiste en porciones de los dominios extracelulares de VEGFR-1 y VEGFR-2 humanos fusionadas con la porción Fc de la inmunoglobulina IgG1 humana. Su uso está aprobado en oftalmología para el tratamiento de la degeneración macular, las oclusiones venosas retinianas y la retinopatía diabética. Aunque no existen estudios específicos para la NVC en humanos, los hallazgos sugieren que el uso de aflibercept podría tener implicaciones terapéuticas importantes en el tratamiento de las patologías neovasculares corneales.

Los estudios clínicos no han descrito efectos secundarios significativos. Aunque los anti-VEGF podrían inhibir o retrasar la respuesta normal de reparación de las heridas en la córnea y causar pérdida de la integridad del epitelio y adelgazamiento estromal [192].

Además, los estudios de la terapia anti-VEGF con anticuerpos indican que el bloqueo del sistema VEGF previene o reduce la neovascularización corneal, pero no es suficiente para una inhibición profunda de la angiogénesis. Una razón para este hallazgo es que otros mediadores de la angiogénesis son también relevantes, los cuales podrían actuar independientemente o en conjunción con el sistema VEGF.

1.4.2. Tratamiento quirúrgico

Debido a que los tratamientos médicos son eficaces principalmente durante el crecimiento activo de los neovasos, muchos investigadores están explorando el tratamiento quirúrgico de la NVC para su eliminación.

1.4.2.1. Tratamiento con láser

La fotocoagulación inducida por láser es un procedimiento que puede ser empleado en el tratamiento de la NVC provocando la coagulación inducida por calor y la oclusión del vaso. El láser Argón, Nd YAG, y láseres amarillos se han utilizado con cierto éxito. Desafortunadamente, el daño que el láser induce en el tejido puede estimular la liberación de factores proangiogénicos que promueven el desarrollo de circulación colateral. El uso combinado de fotocoagulación inducida por láser y tratamientos médicos específicos de la angiogénesis (ej. agentes anti-VEGF) podría superar esta limitación. La fotocoagulación inducida por láser se asocia con un número infrecuente de complicaciones entre las que se incluyen la hemorragia corneal, adelgazamiento corneal, atrofia de iris y escleritis necrotizante [173].

1.4.2.2. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) ha sido descrita para el tratamiento de la NVC. La TFD requiere tres componentes: un compuesto fotosensibilizador, luz y oxígeno. Individualmente esos componentes son inofensivos, pero en combinación son citotóxicos [173].

En el caso de la NVC, el agente fotosensibilizante es liberado a los vasos corneales y activado por la luz láser, destruyendo las células endoteliales y la membrana basal vascular por la generación de reactivos de oxígeno y la cascada del daño oxidativo, produciendo trombosis y remodelación de la arquitectura del vaso [193]. Los agentes fotosensibilizadores como el verteporfin, la fluoresceína, y la dihematoporfirina se han utilizado en el tratamiento de la neovascularización corneal [194, 195]. La terapia fotodinámica realizada con verteporfina o fluoresceína induce la regresión de la NV corneal con un riesgo mínimo. La TFD realizada con dihematoporfirina se ha asociado con efectos adversos sistémicos y locales deletéreos. Combinando TFD con inhibidores específicos de la angiogénesis se podría incrementar la eficacia del tratamiento [196], sin embargo, los altos costes asociados con la TFD han limitado su utilidad clínica.

1.4.2.3. Diatermia con aguja fina

La diatermia con aguja fina es un procedimiento quirúrgico prometedor en el tratamiento de la NV corneal. En este procedimiento, se inserta una aguja paralela o dentro del lumen del vaso de interés. Una sonda de diatermia en modo de coagulación es puesta en contacto con la aguja, dando lugar a la cauterización del vaso. Cada uno de los vasos se trata de forma individual. La diatermia es un procedimiento seguro y efectivo para ocluir vasos corneales específicos, pero todavía tiene que definirse su papel exacto como modalidad de tratamiento primario o asociado a otras modalidades de tratamiento. Si se produce la recanalización de los vasos o el desarrollo de vasos colaterales, se puede repetir el procedimiento [197]. Las complicaciones descritas son el blanqueamiento corneal transitorio y la hemorragia intraestromal [197-199].

La técnica ha sido modificada mediante el uso de una aguja de electrolisis. Esta aguja es más fina y más sensible y podría ser una técnica más versátil en la oclusión de los vasos [198].

1.4.2.4. Reconstrucción de la Superficie Ocular

El restablecimiento de las defensas naturales del ojo es un modo de prevenir o ayudar en la regresión de la neovascularización corneal.

El trasplante de células madre del limbo ha sido utilizado exitosamente en el tratamiento de la deficiencia de células madre limbares [200, 201]. El trasplante autólogo de epitelio limbal cultivado está incrementando su uso como alternativa al trasplante de limbo reconstituyendo la barrera de defensa del limbo corneal y evitando que el epitelio conjuntival y los vasos crezcan hacia la córnea [202, 203].

La membrana amniótica humana ha sido utilizada durante largo tiempo para restaurar la superficie ocular por su capacidad de suprimir la inflamación y promover la curación de las heridas pudiendo constituir una alternativa segura y efectiva al trasplante de limbo para el tratamiento de la NVC [204, 205].

1.5. LOS INHIBIDORES TIROSINA QUINASA (ITQs) Y LOS INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA (IRTQ)

El campo de los fármacos tirosina quinasa ha avanzado mucho desde el descubrimiento de la actividad de la proteína quinasa en 1954. A finales de los 80 y principios de los 90 se hicieron muchos avances en biología molecular descubriéndose muchos genes relacionados con la etiología y progresión del cáncer humano. La identificación de oncogenes capaces de transformar células sanas en células malignas amplió el conocimiento de mecanismos promotores de la progresión del tumor. La identificación de estas oncoproteínas ayudó a identificar mejor a las proteínas tirosina quinasas y sus receptores. En la revista *Science* se publicó en el año 2002 que 518 proteínas quinasas están codificadas en el genoma humano y hasta la fecha, al menos 60 proteínas transmembrana tirosina quinasa han sido identificadas [206, 207].

Los primeros compuestos químicos naturales que se encontraron no fueron inhibidores selectivos de proteínas quinasas pero sirvieron como punto de inicio de la síntesis química [207]. La inhibición de las proteínas quinasas usando pequeñas moléculas constituyó un paso adelante en 1994 cuando el científico Parks-Davis mostró que las 4-anilinoquinazolinonas son potentes inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [208]. Este hallazgo abrió la puerta para posteriores descubrimientos que permitieron el lanzamiento de importantes fármacos inhibidores tirosina quinasa (ITQs). Desde entonces se estima que hay más de 100 ITQs en desarrollo clínico y se están realizando grandes esfuerzos por parte de la industria y de los laboratorios por descubrir nuevos inhibidores.

Como era de esperar, el primer mercado de los inhibidores tirosina quinasa fue desarrollado en oncología, donde las mutaciones de los genes quinasa o la desregulación de la actividad quinasa se asocia a menudo con hiperproliferación celular. No obstante, los ITQs están siendo investigados en otros campos y enfermedades, como la inflamación, diabetes, neurociencia, virología y oftalmología.

1.5.1. Selectividad y especificidad de los ITQs

Las quinasas no fueron consideradas buenos agentes cuando comenzó el estudio farmacológico de los inhibidores de la tirosina [209]. Como las concentraciones celulares de ATP son altas, típicamente 1-5 mM [210], se pensó que sería necesaria una alta concentración de fármaco para conseguir unos resultados eficaces con inhibidores ATP competitivos, conllevando potenciales problemas de toxicidad. Se consideró otro inconveniente el elevado número de enzimas proteína quinasa, todas compartiendo un cofactor común y una estructura tridimensional similar del sitio catalítico, lo que podría interferir en el desarrollo de fármacos adecuadamente selectivos para los receptores. El logro de la selectividad para un particular número de proteínas quinasas supuso un cambio significativo [211].

Los términos específico (explicito, particular o definitivo) y selectivo (caracterizado por una elección cuidadosa) son a menudo usados para describir la actividad inhibitoria del compuesto [211].

Así pues, los fármacos que inhiben más de una quinasa pueden ser tan beneficiosos como útiles sean las dianas terapéuticas sobre las que actúan. Sin embargo, el conocimiento y control de la selectividad es importante ya que una inhibición no dirigida de la quinasa puede también causar toxicidad [212].

Aunque el sitio de unión a ATP de las proteínas quinasas está bastante conservado, las zonas adyacentes no ocupadas por ATP son más variables, particularmente el interior de un bolsillo hidrofóbico y la superficie específica de exposición al solvente. Así pues, diseñando inhibidores que se unan a esas áreas se podrían obtener fármacos más específicos [213].

1.5.2. Clasificación de las ITQs y mecanismos de acción

Las proteínas quinasa catalizan la transferencia del grupo fosfato terminal de la adenosina trifosfato (ATP) al grupo hidroxilo de los residuos de serina, treonina o tirosina de la misma quinasa o de otros sustratos proteicos. La adición de grupos fosfatos puede crear el reconocimiento de sitios para el ligamiento de otras proteínas o puede alterar la conformación de la proteína fosforilada cambiando su estado de activación o su función [211, 214].

Los dominios tirosina quinasa también forman parte de los RTQs, que son proteínas que se encuentran en la membrana celular y que están implicadas en la transducción de señales de supervivencia y crecimiento hacia el interior de la célula en respuesta a los estímulos externos de los factores de crecimiento. Debido a su importancia en la progresión del ciclo celular, crecimiento de las células, apoptosis y metabolismo entre otros procesos [215], los inhibidores de los receptores tirosina quinasa (IRTQ) tienen el potencial de tratar las enfermedades neovasculares.

Los inhibidores quinasa pueden unirse a conformaciones activas o inactivas de la enzima y pueden dirigirse hacia el sitio de unión a ATP, a la zona de unión con el sustrato o a lugares alostéricos [214]. Cuando actúan sobre las quinasas inactivas, la especificidad es más fácil de conseguir debido a la mayor diversidad de conformaciones. Sin embargo, como se conoce menos sobre esas conformaciones, su diseño puede ser más que un reto [215]. No obstante, se han desarrollado modelos para el diseño de inhibidores que se unen a las quinasas inactivas y hay un número considerable de ITQs cuya diana es el estado inactivo.

La clasificación de las moléculas tirosina quinasa depende de la región de interacción en la quinasa y la reversibilidad de la inhibición. En la Tabla 1.7 se muestra la comparación entre los distintos tipos de inhibidores quinasa:

1.5.2.1. Inhibidores tirosina quinasa tipo I

Este tipo de moléculas son competidores de ATP que exhiben una interacción con el sitio catalítico de la conformación activa fosforilada de las quinasas imitando el anillo de purina de la adenina de ATP [216].

Numerosos inhibidores quinasa tipo I han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer (sunitinib, pazopanib, gefitinib, erlotinib, dasatinib, lapatinib, vemurafenib, ruxolitinib, crizotinib y busotinib, etc.). Los inhibidores tipo I muestran una tendencia baja para la selectividad quinasa incrementando el potencial para efectos secundarios [217]. Vatalanib, uno de los IRTQs estudiado en la presente tesis también pertenece a este grupo.

1.5.2.2. Inhibidores tirosina quinasa tipo II

Este tipo representa una molécula no competidora de ATP que interactúa con el sitio catalítico en la conformación inactiva de la quinasa (sin fosforilar), explotando nuevas interacciones dentro de un bolsillo lipofílico debido a un cambio de conformación del residuo de fenilalanina del bucle DFG. El inhibidor reversible interactúa con la quinasa que resulta en la formación de uno, dos o tres enlaces de hidrógeno con la proteína en la “región bisagra” y también causa otras interacciones en el bolsillo DFG abierto. Estas nuevas interacciones lipofílicas con el bolsillo DGF confieren a los inhibidores tipo II un alto grado de selectividad respecto a otras quinasas no deseables. Esas interacciones no se pueden producir cuando la quinasa está en una conformación activa [218].

Uno de los problemas que ha surgido con los ITQs que actúan sobre dianas de las quinasas inactivas es la susceptibilidad para perder la actividad inhibitoria debido a una mutación de la proteína. Esta situación es más difícil que ocurra con los ITQs que actúan sobre una quinasa activa, porque una mutación que evitara la unión del inhibidor, no permitiría la unión de ATP y aboliría la actividad quinasa, lo que podría ser no tolerado [219].

Entre los inhibidores tirosina quinasa tipo II destaca imatinib, sorafenib, regorafenib, motesanib, **axitinib**, tandutinib, quizartinib, tivozanib, masitinib, linifanib, etc.

1.5.2.3. Inhibidores tirosina quinasa tipo III o inhibidores alostéricos

Dirigirse a sitios distintos del sitio de unión a ATP supone circunvalar el posible problema de competir con altos niveles de ATP [220]. Algunas quinasas también contienen sitios alostéricos, bolsillos alejados del sitio de unión a ATP en los que los inhibidores se pueden unir alterando toda la conformación del dominio catalítico e inhibiendo la enzima. En particular, los sitios alostéricos ofrecen la posibilidad de un número muy alto de perfiles inhibidores altamente selectivos o monoespecíficos. Sin embargo, no todas las quinasas tienen un sitio alostérico conocido que sea adecuado [211]. Adicionalmente, los moduladores alostéricos pueden proveer una regulación sutil de quinasas controladas por múltiples factores endógenos lo que no es fácilmente producido por los competidores de ATP [218].

1.5.2.4. Inhibidores tirosina quinasa tipo IV o inhibidores directos de sustrato

Estos inhibidores son descritos como pequeñas moléculas que presentan una interacción reversible fuera del bolsillo de ATP, en el sitio de unión del sustrato a la quinasa, pero sin competir con ATP. Como esta área es única para el sustrato, este tipo de compuesto potencialmente presenta forzosamente un grado alto de selectividad [218].

1.5.2.5. Inhibidores tirosina quinasa tipo V o inhibidores covalentes

Estos IRTQs se dirigen directamente a un nucleófilo catalítico dentro del sitio activo de la enzima y se forma un enlace covalente irreversible. Se trata de una inhibición “suicida” que exhibe una plétora de ventajas como son las largas vidas medias de disociación que maximiza la eficacia más allá del aclaramiento del inhibidor, reduce la exposición del fármaco y minimiza los efectos secundarios. Sin embargo, es necesario definir el potencial de una modificación irreversible de proteínas diana y no-diana y la potencial ausencia de selectividad.

	Tipo I	Tipo II	TIPO III	TIPO IV	Inhibidores covalentes
Tipo de unión	Reversible	Reversible	Reversible	Reversible	Irreversible
Sitio de unión	Sitio ATP	Sitio ATP y bolsillo DFG	Alostérico (por bolsillo ATP)	Alostérico (dominio de unión al sustrato)	Sitio ATP
Competidor-ATP	SI	NO	NO	NO	NO
Selectividad	Baja	Alta	Muy alto	Muy alto	Bajo

Tabla 1.7. Comparación entre diferentes tipos de inhibidores tirosino quinasa.

1.5.3. IRTQs en el tratamiento de las enfermedades sistémicas

Más de 25 inhibidores tirosina quinasa han sido aprobados por la FDA (US Food & Drug Administration) para el tratamiento de las enfermedades oncológicas. En la Tabla 1.8 se exponen los inhibidores quinasa específicos para los receptores (IRTQs) actualmente aprobados para uso sistémico [221].

Año de aprobación	IRTQ	Diana terapéutica	Indicaciones oncológicas actuales
2001	Imatinib	PDGFR-β	LMC, TGI
2003	Gefitinib	EGFR	Pulmón
2004	Erlotinib	EGFR	Pulmón, páncreas
2005	Sorafenib	VEGFR 2-3; PDGFR-β; c-KIT; quinasa Raf	CCR; hígado; tiroides
2006	Sunitinib	VEGFR-2; PDGFR-β; c-KIT	CCR; TGI; TPNE
2007	Lapatinib	EGFR/HER2	Mama
2009	Pazopanib	VEGFR-2; PDGFR-β; c-KIT	CCR; sarcoma
2011	Vandetanib	VEGFR; EGFR; RET	Tiroides
	Crizotinib	ALK	Pulmón
2012	Axitinib	VEGFR 1-3; PDGFR; c-KIT	CCR
	Cabozantinib	VEGFR-2; c-MET	Tiroides; CCR
	Regorafenib	VEGFR-2; Tie-2; PDGFR; c-KIT	TGI
	Afatinib	HER2/Neu	Pulmón
2013	Cabozantinib	RET	Tiroides
	Afatinib	EGFR	Pulmón
2014	Lenvatinib	VEGFR 1-3	Tiroides; CCR
	Gefitinib	EGFR	Pulmón
	Nintedanib	FGFR	Fibrosis pulmonar
	Ceritinib	ALK	Pulmón
2015	Osimertinib	EGFR	Pulmón
	Lenvatinib	VEGFR, RET	Tiroides
	Alectinib	ALK	Pulmón
2017	Neratinib	HER2	Mama
	Brigatinib	ALK	Pulmón
2018	Lorlatinib	ALK	Pulmón
	Larotrectinib	TRK	Tumores sólidos
	Dacomitinib	EGFR	Pulmón

Tabla 1.8. Inhibidores de receptores tirosina quinasa aprobados por la FDA (US Food & Drug Administration). CCR: carcinoma de células renales; LMC: leucemia mieloide crónica; TGI: tumor gastrointestinal; TPNE: tumor pancreático neuroendocrino.

1.5.4. IRTQs y el tratamiento de las enfermedades neovasculares del ojo

Como comentamos anteriormente, las tirosinas quinasas juegan un papel fundamental en la transducción de las señales intracelulares y regulan procesos cruciales como la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales. Así pues, el bloqueo de los RTQ representa un abordaje racional para tratar la NVC.

IRTQ	Estudios	Administración	Diana terapéutica	Patología oftalmológica
Sunitinib	Modelo de ratón [222]	Oral	VEGFR-2; PDGFR- β	NV coroidea
	Modelo de conejo [223-225] Modelo de conejo [225]	Tópico Subconjuntival		NV corneal NV corneal
Sorafenib	Modelo de rata [226]	Oral	VEGFR 2-3; PDGFR- β ; C-KIT; Raf	NV coroidea
	Modelo de rata [227]	Oral		NV corneal
	Caso clínico [228]	Oral		NV coroidea
Semaxinib	Modelo de ratón [229]	Inyección intraperitoneal	VEGFR-2	NV coroidea
	Modelo de rata [230]	Intravítrea		NV coroidea
	Modelo de ratón [231]	Inyección intraperitoneal		NV corneal
Vatalanib	Modelo de ratón [232]	Intravítrea	VEGFR-2 principalmente (VEGFR 1-3, C-KIT)	Isquemia retiniana
	Modelo de ratón [233]	Oral		NVC y trasplante
ZK911	Modelo de ratón [232]	Oral	VEGFR-2	NVC y trasplante
Tirfostina AG1296	Modelo de ratón [234]	Tópica	PDGFR- α y- β	NV corneal
Pazopanib	Modelo de rata [235]	Tópica	VEGFR-1 y -2; PDGFR- β ; C-KIT	NV coroidea
	Modelo de ratón/conejo [236]	Tópica, oral e intravítrea		NV coroidea
	Modelo de rata [237] Ensayo clínico [238-241]	Tópica Tópica		Diabetes NV coroidea
SU9518	Modelo de conejo [242]	Intravítrea	PDGFR- α	Vitreoretinopatía proliferativa
Axitinib	Células del EPR [243]	Instilación	VEGFR1-3; PDGFR- β ; C-KIT	Diabetes
	Modelo de ratón [244, 245]	Oral		NV coroidea
Regorafenib	Modelo de rata [246]	Tópica	VEGFR-2; C-KIT PDGFR; Tie-2	NV corneal
Motesanib	Modelo de ratón [247]	Tópica	VEGFR-2 y -3; PDGFR- β ; C-KIT; RET	NV coroidea

Tabla 1.9. Inhibidores de receptores tirosina quinasa estudiados en el campo de la oftalmología. DMAE: Degeneración macular asociada a la edad; EPR: Epitelio pigmentario retiniano humano; NV: Neovascularización.

En la actualidad no hay ningún IRTQ aprobado para el uso de las enfermedades neovasculares oculares, aunque en los últimos años se ha incrementado el número de estudios experimentales en modelos animales y ensayos clínicos testando distintos principios activos para el tratamiento de patologías oftalmológicas en las que el papel de la angiogénesis juega un papel relevante. Los agentes estudiados actúan bloqueando la señal de los RTQ de VEGF y/o PDGF, fuertemente implicados en la NVC.

La actividad combinada contra las señales de transducción de VEGF y PDGF es beneficiosa, en cuanto que el bloqueo de ambos VEGFR y PDGFR puede contribuir a la inhibición de la angiogénesis. Los inhibidores de PDGF han mostrado producir el desprendimiento de los pericitos de las células endoteliales y, además, los vasos sanguíneos carentes de pericitos son más susceptibles de la depleción de VEGF.

En la Tabla 1.9. se expone un listado de los IRTQs estudiados hasta el momento en el campo de la oftalmología y a continuación comentaremos los que consideramos más relevantes para la introducción de la presente Tesis.

Sunitinib

Sunitinib es un inhibidor del receptor tirosina quinasa de pequeña molécula que exhibe una potente actividad antitumoral y antiangiogénica. Inhibe la angiogénesis disminuyendo la señalización a través de los RTQs VEGFR-1, VEGFR-2 y PDGFR- β . También bloquea otros RTQs implicados en varios tumores como el receptor del factor de células madre (C-KIT), el Flt-3 y el receptor del factor 1 estimulador de colonias (CSF-1R). Takahashi y coautores demostraron en ratones que sunitinib administrado por vía oral fue capaz de reducir significativamente el volumen de las membranas neovasculares coroideas experimentales [222]. Nuestro grupo de investigación estudió la administración tópica de sunitinib 0,5 mg/ml en un modelo corneal de conejo en el que se observó una reducción de la NVC de un 82,3% y resultó ser 3 veces más potente que bevacizumab [223]. Además, sunitinib redujo el calibre de los vasos e indujo cambios morfológicos en el árbol vascular [224]. Puesto que el preparado de sunitinib es de color amarillo, se pudo observar durante el seguimiento de los conejos que parte del fármaco se depositó en la superficie del iris demostrando la penetración del fármaco en la cámara an-

terior del ojo, lo que reforzó la hipótesis de poder utilizar los IRTQs para el tratamiento de las enfermedades neovasculares intraoculares [223]. Posteriormente, Ko y coautores corroboraron nuestros resultados y demostraron que la administración tópica de sunitinib ofrece mejores resultados que la administración subconjuntival [225].

Sorafenib

Sorafenib es un IRTQ multidiana que bloquea las señales de VEGFR-2 y -3, PDGFR- β , C-KIT y la quinasa Raf. Las investigaciones realizadas hasta el momento han testado solamente la administración vía oral. En un modelo de NV coroidea de rata, la administración de sorafenib redujo significativamente el espesor de las membranas neovasculares [226]. Posteriormente, en un modelo de NV corneal de rata, la administración oral de sorafenib disminuyó la NV corneal en un 44% [227]. En humanos, sólo hay descrito un caso clínico de un paciente diagnosticado cáncer de células renales avanzado y degeneración macular en el que el tratamiento vía oral de sorafenib resolvió la neovascularización coroidea y estabilizó la agudeza visual [228].

Semaxinib

Semaxinib es un inhibidor selectivo de VEGFR-2 que también ha mostrado ser eficaz en ratones mediante administración intraperitoneal en el tratamiento de la NV coroidea [229] y corneal [231] y es el único IRTQ que hasta el momento ha sido testado mediante inyección intravítrea utilizando liposomas encapsulados [230].

Vatalanib

Vatalanib inhibe los tres receptores de VEGF, PDGFR- β , C-KIT, pero es selectivo principalmente para VEGFR-2. Su uso en ratones mediante administración intravítrea ha demostrado reducir la neovascularización en la retinopatía angioproliferativa secundaria a isquemia [232]. En un modelo de trasplante de córnea de ratón, los IRTQs vatalanib y ZK991 inhibieron la angiogénesis y linfangio-

génesis, siendo el segundo agente el que mejoró significativamente la supervivencia del trasplante de córnea [233]. Hasta donde podemos conocer, no existe ningún trabajo en el que se haya estudiado la administración tópica de vatalanib.

Pazopanib

Pazopanib es un inhibidor que bloquea los receptores VEGFR-1 y-2, PDGF- β y C-KIT. Pazopanib es el IRTQ más estudiado y el primero utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento de la DMAE exudativa.

En un modelo de NV coroidea de rata, la administración tópica redujo el espesor de la NC coroidea [235]. Del mismo modo, en un modelo de retinopatía diabética de rata, pazopanib tópico consiguió mejorar las alteraciones de la barrera hemato-retiniana [237]. Posteriormente se comprobó que la administración tópica para el tratamiento de la NV coroidea fue efectiva en ratones, pero no en conejos [236].

En humanos, recientemente diversos autores han presentado los resultados de pazopanib tópico para el tratamiento de la DMAE exudativa, sin encontrar beneficios en la agudeza visual ni en el espesor macular como monoterapia [239-241]. En cuanto a la NV corneal, los estudios preliminares han sugerido que el tratamiento con pazopanib 0,5% tópico es seguro y bien tolerado observando una reducción significativa de los neovasos [247].

Regorafenib

Regorafenib es un IRTQ multidiana que inhibe VEGFR-2 y otros factores de crecimiento incluyendo PDGFR y Tie-2. Onder y coautores, en un modelo de quemadura alcalina de córnea en ratas, demostraron los efectos inhibitorios de regorafenib 1mg/ml tópico sobre la angiogénesis corneal, consiguiendo un bloqueo parcial de la neovascularización comparable con los efectos de bevacizumab y dexametasona sin que hallaran diferencias significativas entre los distintos fármacos [246].

Axitinib

Axitinib es un IRTQ multidiana de pequeño tamaño que actúa contra VEGF 1-3, PDGF- β y C-KIT. En un modelo NV corioidea de ratón, axitinib vía oral demostró reducir significativamente las membranas neovasculares incluso con bajas dosis [244, 245]. Hasta la publicación de los resultados de la presente Tesis, axitinib no ha sido testado en ningún modelo de NV corneal y no se ha empleado mediante administración tópica.



2.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

La neovascularización corneal (NVC) es una consecuencia común de varias enfermedades corneales inflamatorias, infecciosas y traumáticas [248]. La neovascularización induce la cicatrización del tejido, los depósitos lipídicos, la hemorragia del estroma y el edema corneal comprometiendo la transparencia corneal y deteriorando gravemente la agudeza visual. Además la vascularización introduce células inmunes circulantes, reduciendo el privilegio inmunológico de la córnea y, subsecuentemente comprometiendo la supervivencia del injerto del trasplante de córnea [193].

La terapia convencional de la NVC se basa en la administración de corticoides. Sin embargo, no son siempre efectivos y a largo plazo puede producir efectos secundarios que incluyen el desarrollo de cataratas, glaucoma y un incremento del riesgo de infección [193].

El conocimiento de algunos de los procesos implicados en la angiogénesis ha permitido el cribado de fármacos potenciales y el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de las enfermedades neovasculares del ojo. La angiogénesis corneal está mediada por numerosos factores que incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor derivado de las plaquetas (PDGF). VEGF es comúnmente considerado el factor angiogénico más prominente, y entre los miembros de la familia VEGF, VEGF-A es considerado el mayor factor implicado en la hemangiogénesis recibiendo la mayor atención como mediador de la neovascularización patológica. VEGF y sus receptores tirosina quinasa promueven muchos aspectos del proceso angiogénico. El VEGF-A y sus receptores tirosina quinasa VEGFR-1 y, particularmente, el VEGFR-2 intervienen en múltiples etapas

del proceso angiogénico. El VEGF-A promueve la permeabilidad vascular, supervivencia, migración y proliferación de las células endoteliales y la formación del tubo capilar [15, 20]. Así pues, los antagonistas del VEGF previenen o reducen la neovascularización siendo de gran utilidad clínica. Por otro lado, el VEGF-C y el VEGF-D se unen al receptor VEGFR-3 con una fuerte capacidad para inducir la linfangiogénesis [249]. La inhibición de la linfangiogénesis mediante el bloqueo de dicho receptor podría ofrecer beneficios en el tratamiento o prevención del rechazo inmunológico del trasplante de córnea. Las células endoteliales vasculares producen el PDGF-B y las células murales (pericitos y células musculares lisas) expresan su receptor, el PDGFR- β . PDGF induce el reclutamiento de pericitos y favorece la maduración de los vasos neoformados [250]. Por tanto, la inhibición combinada de la vía de señalización de ambos factores VEGF y PDGF podría ser más eficaz que la inhibición única del sistema VEGF para el tratamiento de la NVC [223].

El anti-VEGF más empleado en la práctica clínica (off-label) para el tratamiento de la NVC es bevacizumab, un anticuerpo monoclonal recombinante que actúa directamente contra las isoformas de VEGF-A. Aunque los estudios clínicos y experimentales han demostrado que reduce la NVC de forma incompleta [188, 189, 223, 251, 252].

Los inhibidores del receptor tirosina quinasa son moléculas pequeñas que inhiben la cascada de transducción de señales intracelulares estimulada por uno o varios receptores tirosina quinasa [211]. Estas moléculas están bien establecidas como fármacos útiles clínicamente para el tratamiento del cáncer.

Vatalanib es una tirosina quinasa sintética de pequeño peso molecular que presenta potenciales ventajas sobre otros inhibidores de la angiogénesis descritos previamente. Vatalanib estabiliza la tirosina quinasa en una conformación activa (IRTQ tipo I). A concentraciones submicromolares puede actuar contra el receptor de VEGFR-2, con concentraciones ligeramente superiores bloquea VEGFR-1 y, con concentraciones elevadas, tiene capacidad para inhibir receptores tirosina quinasa como VEGFR-3 y PDGFR- β [253].

Axitinib es una potente molécula sintética que estabiliza el dominio quinasa en una conformación inactiva (IRTQ tipo II) y que inhibe la señal de transducción de VEGF. Axitinib, a concentraciones picomolares *in vitro* es altamente selectivo inhibiendo la autofosforilación de los receptores VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 con concentraciones 10 veces menores que otros IRTQ utilizados en el tratamiento del cáncer. Además a concentraciones nanomolares también inhibe los receptores PDGF- β [254].

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existe ningún trabajo en el que se haya estudiado la administración tópica de vatalanib y axitinib para evaluar sus efectos antiangiogénicos sobre la neovascularización corneal. Así pues, el propósito de la presente Tesis es investigar la capacidad antiangiogénica de vatalanib (IRTQ tipo I) y axitinib (IRTQ tipo II) mediante la administración tópica en un modelo de NVC inducido por suturas. Los efectos de la inhibición han sido analizados mediante el análisis de fotografías biomicroscópicas y estudios histológicos.

2.2. HIPÓTESIS

2.2.1. Hipótesis general

La administración tópica de los fármacos utilizados (vatalanib y axitinib) en un modelo experimental animal de neovascularización corneal inducido mediante suturas, inhibe la formación de neovasos corneales a través del bloqueo multidiaria de los receptores tirosina quinasa de los factores proangiogénicos VEGF y PDGF.

2.2.2. Hipótesis específicas

Para concretar la hipótesis general se establecen las siguientes hipótesis específicas:

1. La administración tópica de **vatalanib** (IRTQ tipo I), con capacidad para inhibir los receptores de VEGF (VEGFR-1 y VEGFR-2) principalmente y los receptores de PDGF y la administración tópica de **axitinib** (IRTQ tipo II), con capacidad de bloquear selectivamente los receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3) e inhibir los receptores de PDGF, a las dosis empleadas, producen la inhibición de la superficie de

neovascularización corneal inducidos mediante un modelo basado en suturas en el animal de experimentación.

2. En base al papel crucial que desempeña VEGF en la angiogénesis, en nuestro modelo de NVC, la administración tópica de **axitinib** que bloquea *in vitro* los receptores VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 a concentraciones picomolares, produce una mayor inhibición vascular que **vatalanib** que, *in vitro*, bloquea los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 a concentraciones micromolares.
3. La administración tópica de cada inhibidor de la tirosina quinasa a las concentraciones empleadas inducen cambios en la morfología y la microdensidad vascular.
4. La administración tópica de cada inhibidor de la tirosina quinasa a las concentraciones empleadas no induce efectos adversos oculares.

2.3. OBJETIVOS

Para la comprobación de dicha hipótesis, la presente Tesis Doctoral se va a desarrollar buscando la consecución de los siguientes objetivos de trabajo:

- 1) Cuantificar el grado de inhibición de la superficie neovascular tras la administración tópica de las diferentes concentraciones de **vatalanib y axitinib** mediante biomicroscopía de la superficie córnea en el modelo experimental animal.
- 2) Cuantificar la densidad microvascular corneal y determinar los cambios en la morfología vascular tras la administración tópica de las diferentes concentraciones de **vatalanib y axitinib** mediante el estudio de la densidad microvascular corneal con técnicas de tinción enzimática en el modelo experimental animal.
- 3) Comparar las respuestas de los distintos inhibidores de la tirosina quinasa utilizados en la inhibición de la neovascularización corneal en el modelo experimental animal.
- 4) Evaluar clínicamente los efectos secundarios oculares producidos por los distintos fármacos administrados en el ojo de conejo.

3.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material y los métodos empleados en la presente Tesis Doctoral tienen como objeto la consecución de las siguientes fases del proyecto:

3.1. Selección de los inhibidores de los receptores tirosina quinasa

En la presente Tesis Doctoral se han sometido a estudio 2 antiangiogénicos: axitinib y vatalanib. Estos inhibidores de la tirosina quinasa (IRTQ) fueron seleccionados en base a los siguientes criterios.

3.1.1. Criterios de selección de los IRTQs

Selectividad del IRTQ por el sustrato

El diseño de inhibidores selectivos se ha convertido en una actividad crítica en el desarrollo de nuevos fármacos y también en la aplicación de los inhibidores como herramientas para la investigación biológica química. Mientras la investigación inicialmente se focalizaba en encontrar inhibidores de la tirosina quinasa mono-específicos o muy altamente selectivos para el uso terapéutico, la experiencia clínica y el creciente conocimiento de la biología de las quinasas ha mostrado que los compuestos con un patrón más amplio de inhibición pueden ser efectivos. Sin embargo, como compuestos necesitan ser inhibidores selectivos o inhibir un conjunto de enzimas quinasas bien definido [211].

Muchos inhibidores quinasa que están ya en uso clínico para tratar el cáncer son no selectivos para una quinasa en particular actuando sobre varios objetivos. Esto puede traer beneficios de eficacia ya que las otras quinasas también están implicadas en los mismos procesos pero podría incrementar la toxicidad y los efectos secundarios indeseados debidos a la interacción con otras enzimas, canales

de calcio o receptores e inhibición de otras quinasas. Es importante, así pues, conocer los objetivos moleculares de los fármacos con los que pueden interactuar y qué enzimas pueden inhibir [211].

En los años recientes, se ha señalado que los inhibidores tirosina quinasa pueden tener beneficios siendo fármacos selectivos, pero no específicos. Por ello, nuestro objetivo ha sido seleccionar agentes que sean selectivos para tirosinas quinasas que actúen inhibiendo los receptores de los factores de crecimiento del proceso angiogénico.

Solubilidad

Los inhibidores de la tirosina quinasa son compuestos poco solubles en H₂O. Para conseguir su solubilidad se pueden diluir con DMSO. El DMSO, a bajas concentraciones, se utiliza como potenciador de la absorción de numerosas preparaciones oftálmicas. Furrer y coautores llegaron a la conclusión de que el DMSO al 1% era seguro y bien tolerado por la superficie ocular [255]. Debido al potencial efecto irritante del DMSO a dosis superiores al 1% y la evidencia de la asociación entre la inflamación y la angiogénesis, decidimos no utilizar DMSO y emplear el IRTQ en suspensión. Por ello, probamos varios IRTQs para comprobar el grado y las características de las partículas en suspensión. Así pues, descartamos agentes como pazopanib o motesanib que a las concentraciones seleccionadas presentaban una rápida precipitación de la sustancia y el acúmulo en forma de agregados en las paredes del continente.

Color

Otro de los criterios que consideramos fue el color de la sustancia, puesto que en un estudio que realizamos previamente en conejos con sunitinib, un IRTQ de color amarillo, la administración tópica durante dos semanas provocó una tinción amarilla en el epitelio corneal y el iris. Aunque este efecto adverso es transitorio y el depósito del fármaco en la superficie del iris sirvió como trazador para demostrar la buena penetración de sunitinib en la cámara anterior del ojo, se trata de un efecto secundario no deseable para una posterior aplicación clínica. Por ello,

seleccionamos fármacos de color blanco y que tras ser diluidos en suero fisiológico fueran incoloros.

3.1.2. Vatalanib (PTK/ZK 222584)

Vatalanib, una anilino-ftalacina, es uno de los primeros inhibidores de la tirosina quinasa (IRTQ) sintéticos. Se trata de una molécula de tamaño pequeño con un peso molecular de 419,73 Da (Figura 3.1).

Vatalanib bloquea la actividad del receptor tirosina quinasa mediante su unión competitiva al dominio de ATP en una conformación activa (IRTQ tipo I). *In vitro*, vatalanib inhibe los receptores tirosina quinasa de VEGF en rangos submicromolares. Este bloqueo de la actividad del receptor es ligeramente más potente contra VEGFR-2 que contra VEGFR-1. A mayores concentraciones, también inhibe otros receptores tirosina quinasa como VEGFR-3 y el receptor- β de PDGF (Tabla 3.1).

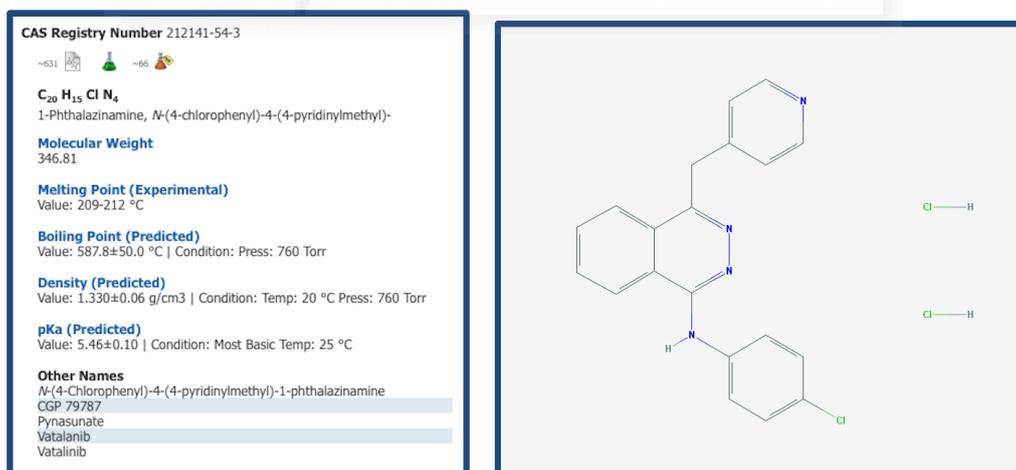


Figura 3.1. Estructura de vatalanib (PTK/ZK). Extraído de SciFinder (<https://origin-scifinder-cas-org.publicaciones.umh.es/scifinder>) y Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

RECEPTOR	ACTIVIDAD IN VITRO DE VATALANIB
	IC ₅₀ celular (μM)
VEGFR-1	0,077
VEGFR-2	0,037
VEGFR-3	0,66
PDGFR-β	0,58
FGFR-1	No activo

Tabla 3.1. Inhibición celular de la autofosforilación del receptor por vatalanib [253].

3.1.3. Axitinib (AG-013736)

Axitinib es un potente IRTQ de pequeña molécula derivado del indazol que ha demostrado actividad contra un amplio rango de tipos tumorales y se ha mostrado prometedor como un nuevo agente anticanceroso. Axitinib es una pequeña molécula con un peso molecular de 386,47 Da (Figura 3.2).

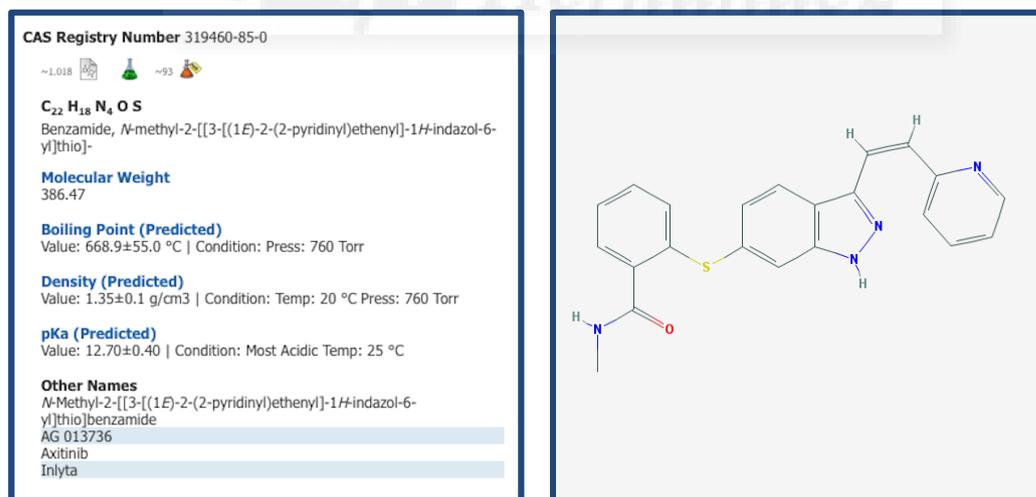


Figura 3.2. Estructura de axitinib (AG-013736). Extraído de SciFinder Scholar (<https://origin-scifinder-cas-org.publicaciones.umh.es/scifinder>) y Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

A concentraciones picomolares, es un potente y altamente selectivo inhibidor de los receptores tirosina quinasa de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3). A concentraciones nanomolares, también inhibe los receptores PDGF- α y PDGF- β .

In vitro, axitinib se une de forma no competitiva al dominio intracelular de ATP de VEGFR. Su pequeña estructura permite un ajuste cercano en un bolsillo dentro del dominio quinasa (Figura 3.13). Esto resulta en la estabilización de la quinasa en una conformación inactiva y en la inhibición de la señal de transducción de VEGF [254]. En los estudios *in vitro* de inhibición de la fosforilación del RTQ la IC50 de los VEGFR 1-3 (0,1-0,3 nmol/l) fue 10 veces menor que la de pazopanib, sunitinib y sorafenib [256-259]. Estos resultados testifican la alta potencia y selectividad contra VEGFRs a pequeñas concentraciones. En lo concerniente a otros RTQs distintos de VEGF (PDGF, FGF, c-kit, RET), la IC50 de axitinib fue de $\geq 1,6$ nmol/ml. A concentraciones nanomolares tiene capacidad para inhibir PDGFR y a niveles submicromolares FGFR-1 (Tabla 3.2) [207, 260].

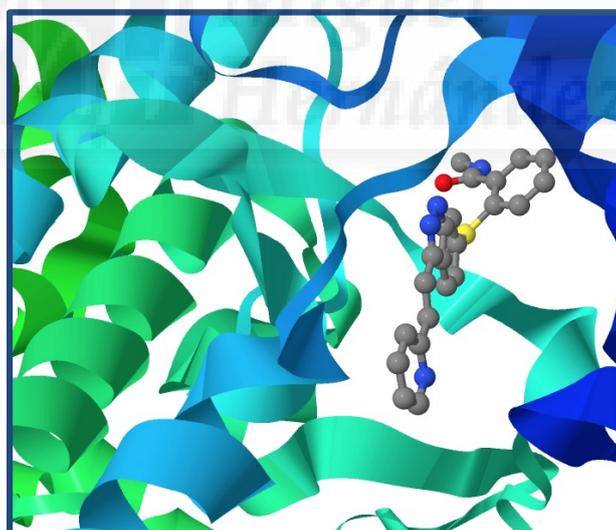


Figura 3.3. Axitinib interactuando con el dominio quinasa del receptor VEGFR-2. Extraído de Protein Data Bank (<http://www.rcbs.org>). Creado por McTigue, M.J., Murray B.W., Chen J.H., Deng Y. Soloeiej J. y Kania, R.S, Id: 4AG8. Jmol: visor de Java de código abierto para estructuras químicas en 3 dimensiones (<http://www.jmol.org>).

RECEPTOR	ACTIVIDAD IN VITRO DE AXITINIB
	IC ₅₀ celular (μM)
	Inhibición de la fosforilación del receptor
VEGFR-1	0,0001
VEGFR-2	0,0002
VEGFR-3	0,0001-0,0003
PDGFR-β	0,0016
PDGFR-α	0,005
FGFR-1	0,231

Tabla 3.2. Inhibición celular de la autofosforilación del receptor por axitinib [207, 256].

3.1.4. Preparación de los IRTQs

La selección de las concentraciones tópicas de cada fármaco se ha fundamentado en tres criterios:

Criterio 1

Emplear concentraciones de vatalanib y axitinib equiparables a los estudios previos de bevacizumab para obtener unos resultados comparables (5 mg/ml). Bevacizumab es el antiangiogénico que ha sido más empleado para el tratamiento de la NVC mediante administración tópica. (Véase apartado 1.6. tratamiento).

Bevacizumab administrado de forma tópica se usa a concentraciones muy superiores a las concentraciones inhibitorias observadas en los estudios in vitro. Para conseguir unas dosis equiparables a bevacizumab, como referencia hemos considerado la inhibición de la proliferación celular (IC₅₀) inducida por VEGF165 humano recombinante en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) actuando sobre el receptor VEGFR2. Las concentraciones de los fármacos para uso tópico se obtuvieron a partir del producto de su IC₅₀ X 222.222 (basado en que la concentración utilizada de bevacizumab de 5 mg/mL es aprox. 222.222 veces su IC₅₀) (Tabla 3.3).

	IC50 x 222222	Concentración tóxica
Bevacizumab	22,5 µg/l x 222.222	5 mg/ml
Vatalanib	15,53 µg/l x 222.222	3,45 mg/ml
Axitinib	0,07 µg/l x 222.222	0,017 mg/ml

Tabla 3.3. Concentraciones tóxicas de los fármacos equiparables a bevacizumab.

Criterio 2

Conseguir unas concentraciones de vatalanib y axitinib equiparables a 0,5 mg/mL de sunitinib, en base a la experiencia de nuestro grupo de investigación con el IRTQ sunitinib en estudios previos [223, 224]. Esta concentración se calculó teniendo en cuenta el peso molecular de cada fármaco con la finalidad de emplear el mismo número de moles: Vatalanib (419,73 daltons): 0,39 mg/mL y axitinib (386,47 daltons): 0,36 mg/mL (Tabla 3.4).

	Peso Molecular	Concentración tóxica
Sunitinib malate	532,56	0,5 mg/mL
Vatalanib 2HCL	419,73	0,39 mg/mL
Axitinib	386,47	0,36 mg/mL

Tabla 3.4. Concentraciones tóxicas de los fármacos equiparables a sunitinib.

Criterio 3

En base a los cálculos realizados a partir de criterios anteriores se seleccionaron las siguientes concentraciones para los fármacos a estudio: vatalanib (0,4 mg/mL y 3,5 mg/mL) y dos de axitinib (0,02 mg/mL y 0,35 mg/mL).

Como las dos concentraciones del fármaco axitinib son inferiores a los 0,5 mg/mL de sunitinib se decidió añadir otro grupo de axitinib con una concentración de 0,5 mg/dL.

Para la preparación, todos los antiangiogénicos se disolvieron en suero fisiológico hasta alcanzar la concentración tópica deseada.

Los diferentes antiangiogénicos se obtuvieron de los siguientes proveedores:

1. Vatalanib se preparó a partir del principio activo puro proporcionado por laboratorios LC (vatalanib dihidrocloruro, LC Laboratories, Woburn, MA, USA): vatalanib 0,4 mg/ml (pH 3,75) y vatalanib 3,5 mg/ml (pH 4,5).
2. Axinitib se preparó a partir del principio activo proporcionados por laboratorios LC (axitinib base libre, LC Laboratories, Woburn, MA, USA): axitinib 0,02 mg/mL (pH 7,32), axitinib 0,35 mg/ml (pH= 7,42) y axitinib 0,5 mg/ml (pH 7,45).

3.2. Animales de experimentación y grupos de estudio

Se utilizaron 72 conejos New Zealand machos de 2,5 meses de edad y un peso comprendido entre 2.5 y 3 Kg. Los conejos se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos (12 conejos por grupo) correspondientes a cada uno de los fármacos seleccionados: **Grupo A (Grupo control)**: Suero Fisiológico; **Grupo B**: Vatalanib (0,4 mg/ml); **Grupo C**: Vatalanib (3,5 mg/ml); **Grupo D**: Axitinib (0,02 mg/ml); **Grupo E**: Axinitib (0,35 mg/ml); y **Grupo F**: Axitinib (0,5 mg/ml) (Figura 3.5.).

En el ojo derecho de cada conejo se realizó un modelo de neovascularización corneal con un patrón triangular de suturas de seda virgen de 8/0 (véase apartado 3.5). Al día siguiente, se inició el tratamiento con el agente seleccionado mediante administración tópica con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 2 semanas.

Grupo A	Grupo B	Grupo C
Suero Fisiológico	Vatalanib (0,4 mg/ml)	Vatalanib (3,5 mg/ml)
2 gotas cada 8 horas (12 conejos)	2 gotas cada 8 horas (12 conejos)	2 gotas cada 8 horas (12 conejos)
Grupo D	Grupo E	Grupo F
Axitinib (0,02 mg/ml)	Axitinib (0,35 mg/ml)	Axitinib (0,5 mg/ml)
2 gotas cada 8 horas (12 conejos)	2 gotas cada 8 horas (12 conejos)	2 gotas cada 8 horas (12 conejos)

Tabla 3.5. Distribución de los grupos experimentales

El seguimiento fue de 2 semanas en todos los grupos experimentales. Bajo anestesia, se realizó un control fotográfico con lámpara de hendidura los días 3, 7 y 14 con la finalidad de cuantificar la superficie de estímulo angiogénico (área cubierta por suturas, ACS) en el día 3, la superficie de neovascularización corneal (SNVC) en el día 7 y 14, y valorar los posibles efectos secundarios del tratamiento.

A las dos semanas, se sacrificaron los conejos y se procesaron las córneas para el estudio mediante tinción enzimática de la microdensidad vascular y el análisis de la morfología vascular (8 ojos) y el estudio anatómopatológico de la córnea (4 ojos).

La medición y la cuantificación de todos los procedimientos experimentales fueron realizadas por un examinador enmascarado para todos los grupos de tratamiento.

Todos los procedimientos y la experimentación con los animales fueron realizados de acuerdo a las normas para mantenimiento y manipulación de animales de la ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) y al Real Decreto 53/2013, de 1 de Febrero, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

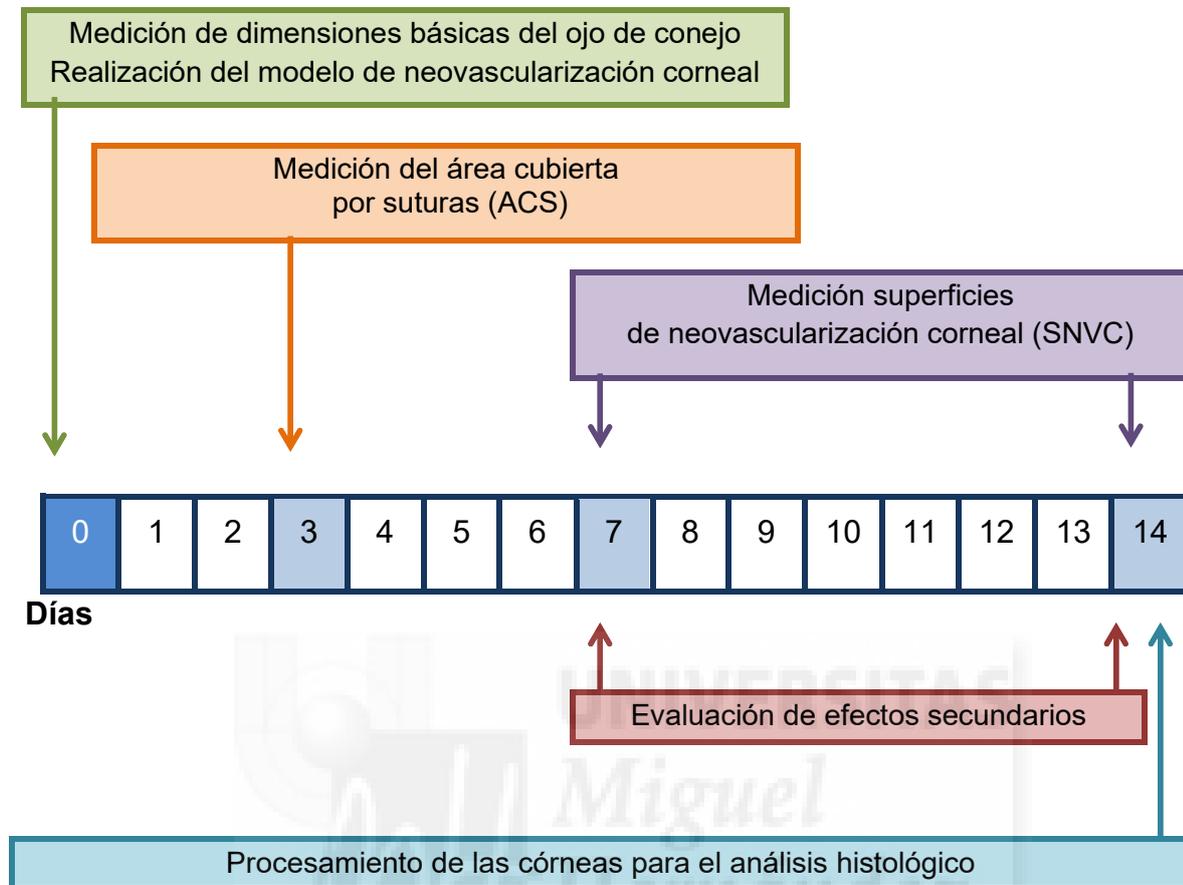


Figura 3.4. Cronología de los procedimientos.

3.3. Anestesia

La anestesia general inyectable, es uno de los recursos que pueden utilizarse en esta especie para procedimientos cortos y puede brindar un control satisfactorio permitiendo un grado de inmovilización y relajación importante. La anestesia en el conejo presenta varios problemas: uno de ellos es su elevada tasa metabólica que hace que los tiempos anestésicos tiendan a ser mas cortos y otra dificultad que presenta esta especie es la variabilidad en la desaparición de los reflejos, utilizados para la monitorización anestésica. Esta variabilidad está en relación directa con el grado de profundización anestésica y planos de la misma y pueden verse afectados por las drogas empleadas.

Se utilizaron los siguientes fármacos anestésicos por vía intramuscular en los grandes músculos (cuádriceps o glúteos):

- ketamina (Imalgene 1000 ®): dosis 20 mg/Kg
- xilacina (Xilagesic 2% ®): dosis 6 mg/Kg

Con las técnicas anestésicas inyectables, se puede trabajar cómodamente en procedimientos cortos de no más allá de 20 a 30 minutos para evitar repetidas inyecciones.

Las infiltraciones se complementaron con la aplicación tópica de una gota de colirio anestésico (oxibuprocaina hidrocloreto 0,4% y tetracaína hidrocloreto 0,1%, Colircusí Anestésico Doble®, Alcon Cusí SA, Barcelona).

Cuando se observó reacción de dolor a la presión del espacio interdental, se prosiguió inoculando anestésico sistémico hasta la desaparición del dolor reflejo.

Conjuntamente con la monitorización de la frecuencia respiratoria (respiraciones/minuto y profundidad de las mismas), el control de la temperatura corporal es uno de los parámetros que se tuvo cuenta. El conejo tiene una alta tasa metabólica y un cuerpo relativamente pequeño, eso lo hace proclive a la hipotermia durante la anestesia. Por ello, el animal se colocó sobre una superficie que garantizase el aislamiento de la mesa evitando pérdidas de calor. Mantener el quirófano con temperatura situada entre los 20 y los 22 °C contribuyó notoriamente a la reducción de la presencia de hipotermia, la cual puede llevar a complicaciones anestésicas, muerte súbita, recuperación prolongada o profundización extrema de la anestesia.

La vía endovenosa se reservó para la eutanasia de los animales mediante la punción de las venas de la oreja rasurando previamente la zona, utilizando alcohol para mejorar la marcación y visualización de la vena, y comprimiendo proximalmente a la zona de punción para facilitar la ingurgitación del vaso.

3.4. Determinación de las dimensiones del ojo de conejo

Tras la inducción anestésica y antes de aplicar el modelo neovascularización corneal mediante la colocación de las suturas, se midieron las dimensiones de cada córnea.

Se midieron los diámetros corneales horizontal y vertical utilizando un compás calibrado. La profundidad de la cámara anterior (PCA) se determinó usando un biómetro de ultrasonidos estándar (Ocuscan RxP, Alcon Laboratories Incorporated, Forth Worth, TX, USA). Una vez tabulados los datos, se estimó el área de toda la superficie corneal con estas mediciones, considerando la forma de la córnea, utilizando la fórmula de la cúpula esférica: $S = \pi (r^2 + h^2)$, donde r representa el radio de la base ($r=d/2$), h representa la altura de la cúpula y $\pi = 3,14159$. El radio (r) se calculó a partir del diámetro corneal (media del diámetro corneal vertical y horizontal; d) y la altura (h) de la cúpula (profundidad de la cámara anterior).

3.5. Técnica quirúrgica del modelo de NV corneal mediante un patrón triangular de suturas

En el año 2006, nuestro equipo de investigación elaboró un nuevo modelo experimental de NV corneal inducida por suturas con la finalidad de conseguir un modelo eficaz, fiable y reproducible en la generación de neovasos en la córnea. El modelo experimental fue publicado en la revista *Ophthalmic Research* en 2010 [261] y se trata de una modificación de otras técnicas de suturas interrumpidas descritas con anterioridad.

El modelo experimental se basa en la colocación de 5 puntos de sutura de seda virgen azul de 8/0 (LorcaMarin SA, Murcia, España) en el estroma medio de la córnea superior siguiendo un patrón triangular con base en limbo.

Se inicia marcando epitelio corneal utilizando un marcador de queratotomía radial impregnado con violeta de genciana (Figura 3.5).

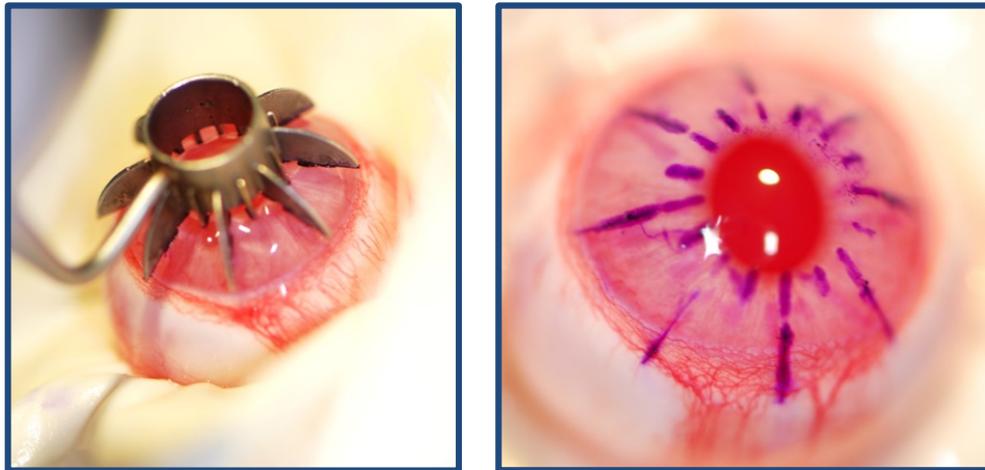


Figura 3.5. Marcado de la córnea con marcador de queratotomía radial.

Utilizando el microscopio quirúrgico, se colocan las dos primeras suturas, de aproximadamente 3,8 mm de longitud, paralelas al limbo corneal y a 1,5 mm del mismo. A continuación, se realiza la segunda fila con dos puntos de sutura de 3 mm de longitud paralelos a la primera fila y a 1,5 mm de esta última. Por último, se realiza un único punto de sutura de 2 mm de longitud a 1,5 mm de la segunda fila cercano al vértice del triángulo (Figura 3.6. y Figura 3.7.). Puesto que el espesor de la córnea de conejo es más fino que el espesor de la córnea humana (400 micras), los puntos deben realizarse de forma controlada debiendo evitar perforar la córnea. Con la finalidad de incrementar la reproducibilidad de la técnica, la intervención se llevó a cabo por el mismo cirujano. Después del procedimiento quirúrgico se administró pomada oftálmica de eritromicina 3 veces al día durante 24 horas.

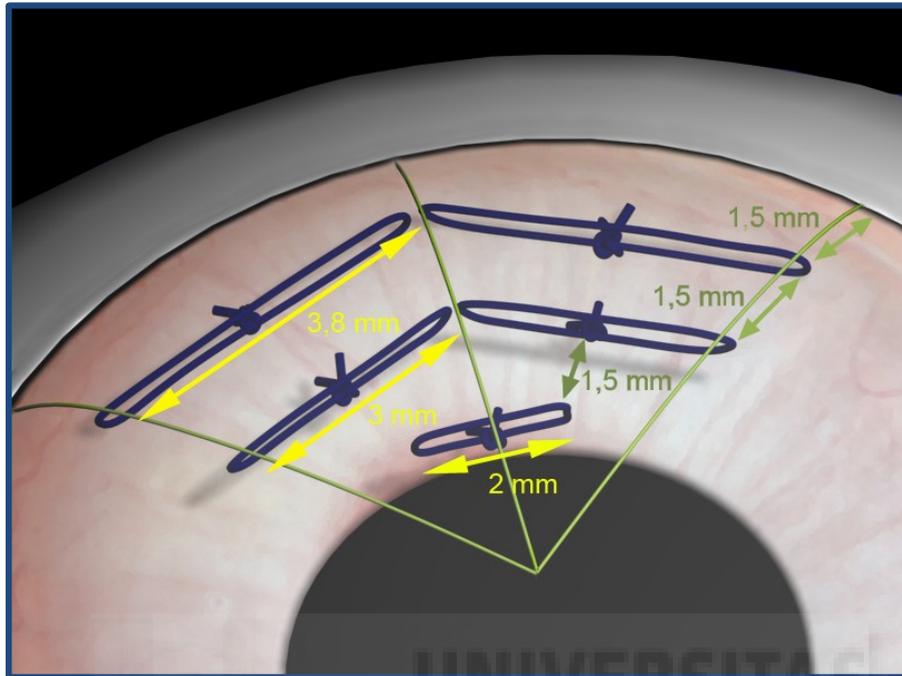


Figura 3.6. Modelo de NVC mediante patrón triangular de suturas con base en limbo.

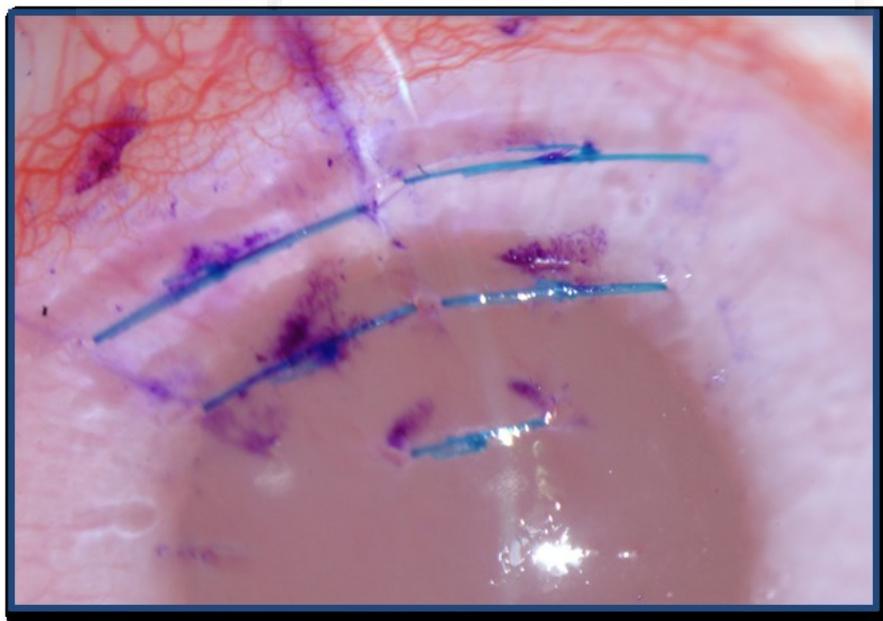


Figura 3.7. Resultado del modelo de NVC después de la intervención quirúrgica.

3.6. Determinación del área de estímulo (ACS)

Se tomaron dos fotografías color calibradas de cada córnea para medir el área corneal cubierta por las suturas (ACS) en el día 3 del seguimiento. Las fotografías corneales se realizaron con una magnificación X 10 utilizando una cámara digital FinePix S2Pro (Fuji Photo Film Corporation Limited, Tokio, Japón) unida a la lámpara de hendidura (SL-D7, Topcon Corporation, Tokio, Japón). Se usó un programa informático Image-Pro Plus V.6.0. (Media Cybernetics Incorporated, Bethesda, Maryland, EEUU) diseñado para el procesado y análisis de imagen. Como aplicación de análisis de imagen, el programa proporciona un completo rango de utilidades de captura, procesado, medida, análisis. Los resultados de las ACS se expresaron en mm^2 (Figura 3.8).

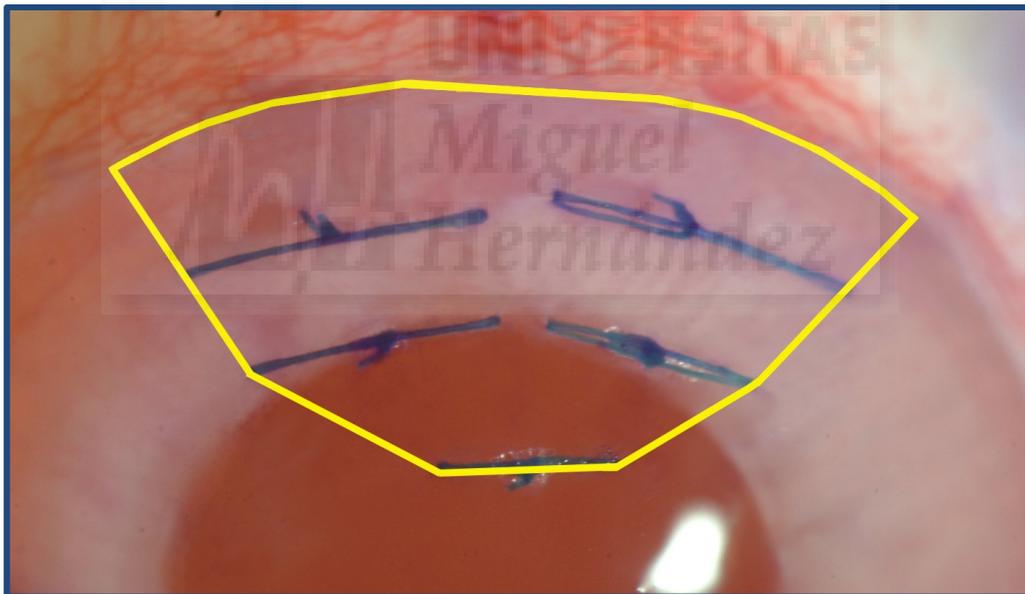


Figura 3.8. Medición de área de estímulo representado por el área cubierta por suturas (ACS).

3.7. Cuantificación de la superficie de NV corneal (SNVC)

Bajo anestesia, las córneas de los conejos fueron evaluadas en la lámpara de hendidura. Se tomaron fotografías con una magnificación X 10 de la SNVC con la lámpara de hendidura SL-D7 dotada de la cámara fotográfica digital FinePix

S2Pro los días 7 y 14 del estudio. De cada córnea se realizaron dos fotos a color y una aneritra calibradas mediante una regla graduada con apreciación de 0,5 mm. Las imágenes obtenidas presentaron una resolución de 624 x 480 píxeles. De cada fotografía, mediante el programa de análisis de imagen Image-Pro Plus V.6, se midió la SNVC. Se tuvo en consideración el valor medio de las 3 fotografías.

La SNVC medida en las fotografías calibradas se expresó en mm² y como porcentaje del área cubierta por suturas.

3.8. Estudio de la morfología y la microdensidad vascular.

De cada grupo se seleccionaron 8 ojos para el estudio de la morfología y la microdensidad vascular. Las córneas se seccionaron obteniendo un bloque de tejido triangular que contenía el área cubierta por las suturas y, por tanto, la superficie de NV corneal (SNVC) (Figura 3.9).

Los bloques de tejido corneal se tiñeron mediante histoquímica enzimática, que se basa en la capacidad que tienen algunos enzimas del tejido de mantener funcional su centro activo tras el proceso de fijación. Estos enzimas y las células que los poseen se ponen de manifiesto mediante una reacción enzimática que convierte a unos sustratos solubles e incoloros en productos insolubles y coloreados. No se incluyó el material en medios como la parafina puesto que la deshidratación y la temperatura elevada pueden dañar la conformación de la enzima y por tanto la actividad de su centro activo. Por ello estas técnicas se practicaron en secciones obtenidas por congelación.

La actividad NADPH diaforasa se asocia a las enzimas sintasas del óxido nítrico en el sistema nervioso y vascular. A estos enzimas se les ha relacionado con el control del flujo sanguíneo y con ciertos aspectos de la fisiología del sistema nervioso. Esta técnica permite detectar células endoteliales que expresan la enzima sintasa del óxido nítrico de una forma sencilla y rápida. La reacción es NADPH + tetrazolio = NADP+ formazán. Es el formazán el producto coloreado e insoluble que se puede observar con el microscopio óptico (Figura 3.9).

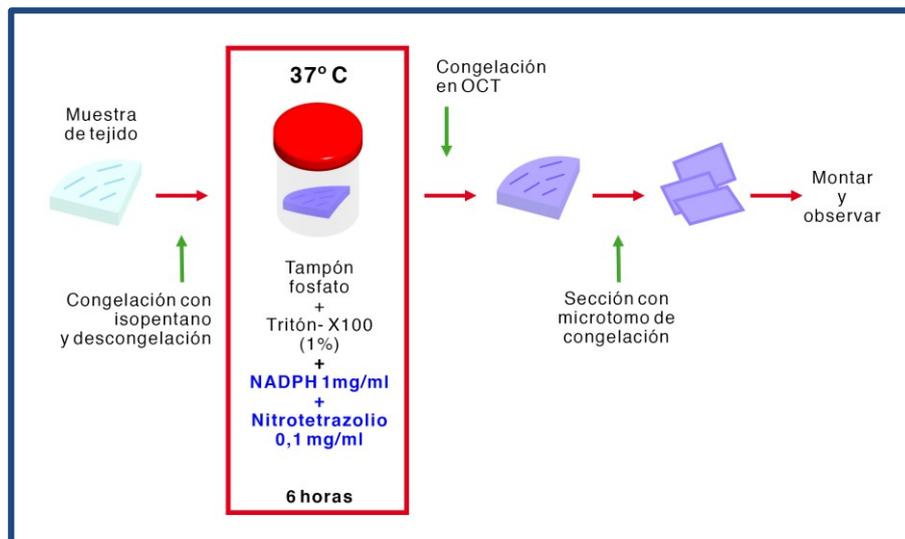


Figura 3.9. Preparación de las piezas histológicas para el estudio de microdensidad vascular. En primer lugar, los bloques de tejido corneal se congelaron en isopentano y posteriormente, se descongelaron generando microrroturas tisulares que facilitan la entrada de los distintos compuestos empleados en la técnica histoquímica. A continuación, las secciones se incubaron durante 6 horas a 37°, en la oscuridad, en una solución NADPH 1 mg/ml con nitro-tetrazolio 0,1 mg/m (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en Tritón X-100 1% (Sigma Alcrich, St. Louis, MO, USA). Por último, se congelaron en OCT (Optimal cutting temperature) y se seccionaron con un microtomo de congelación.

3.8.1. Estudio de la morfología vascular

Antes de la sección de las córneas, los ojos de cada grupo se destinaron al estudio de la morfología vascular. Los neovasos se dibujaron sobre papel DIN A3 usando una cámara lúcida incorporada a un microscopio óptico (Leika Microsystems Limited Heerbrugg, Suiza).

La cámara lúcida superpone la imagen microscópica de los neovasos y la imagen del papel sobre el que se dibuja. De este modo, permite realizar un calco de la neovascularización en distintos planos donde enfoca el microscopio consiguiendo proyectar sobre el papel los neovasos de todo el espesor corneal (Figura 3.10.).

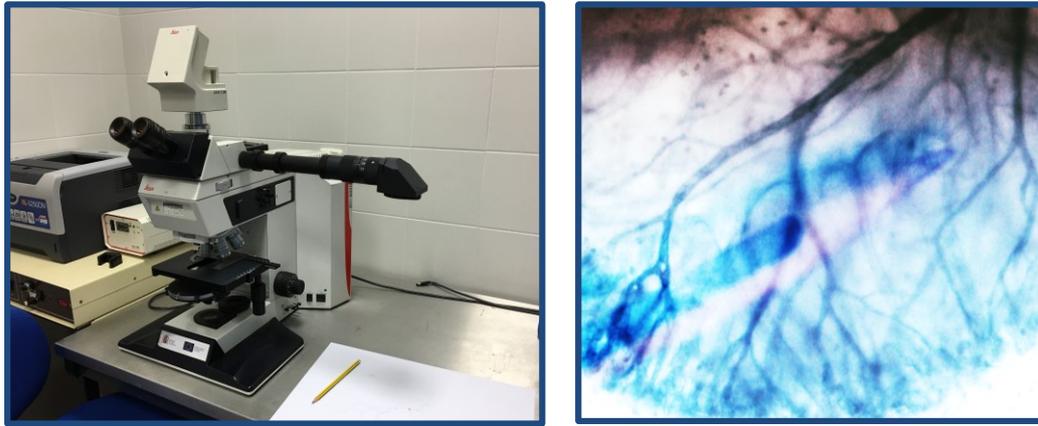


Figura 3.10. Izquierda: cámara lúcida adaptada a microscopio óptico; Derecha: superposición de la imagen del microscopio con la imagen del papel donde se van a dibujar los neovasos generada por la cámara lúcida.

Se dibujaron los neovasos visualizados en el microscopio (X 10 aumentos) de dos áreas calientes (Áreas 1 y 2) de aproximadamente 2 x 1,5 mm cercanas al limbo (Figura 3.11). Una vez dibujadas las SNVC, se realizó un estudio descriptivo comparando las características morfológicas de la respuesta vascular de cada uno de los grupos.

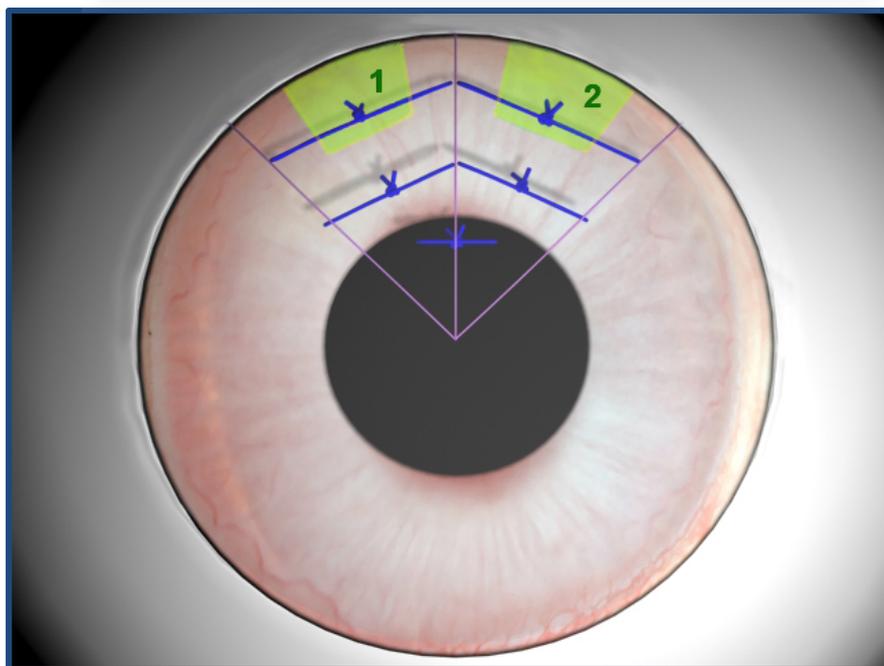


Figura 3.11. Áreas de superficie vascular dibujadas mediante cámara lúcida.

3.8.2. Estudio de la microdensidad vascular

Posteriormente se obtuvieron cortes histológicos de 20 μm usando el microtomo de congelación. Tal como se muestra en la Figura 3.12., se analizaron 2 zonas del área cubierta por suturas. La Zona 1, localizada entre el limbo y la primera hilera de puntos de sutura, y la Zona 2, entre la primera y segunda hilera.

De cada zona, se seleccionaron dos puntos situados a 750 μm del limbo en la Zona 1 (secciones A y B) y a 2250 μm del limbo en la Zona 2 (secciones C y D) y centrados a nivel de la mitad de cada sutura tal como se muestra en el esquema.

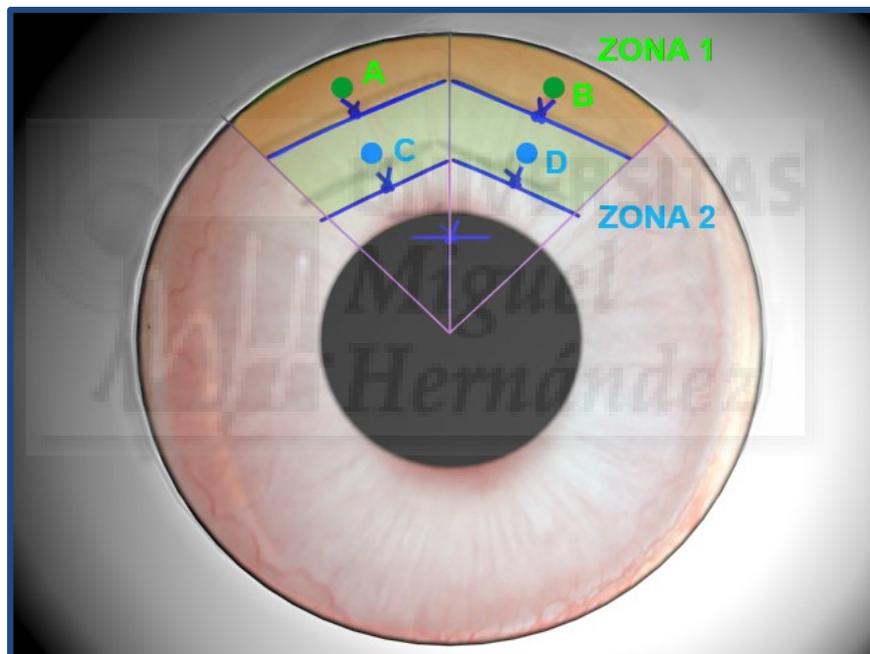


Figura 3.12. Zonas de estudio de la microdensidad vascular.

En el microscopio óptico, x 100 aumentos, se realizaron fotografías calibradas, con un campo de 1368 x 1094 μm (anchura x altura). Se usó un programa informático Image-Pro Plus diseñado para el procesado y análisis de imagen que se puede adaptar a microscopios o cualquier otro método de captura de imágenes. Como aplicación de análisis de imagen, el programa proporciona un completo

rango de utilidades de captura, procesado, medida, análisis. Utilizando el programa informático Image-Pro Plus, se midió el área de estroma corneal de cada fotografía. El área de estroma corneal de ambas secciones de la misma zona se sumó consiguiendo el área estromal total de cada zona a estudio (Figura 3.13.).

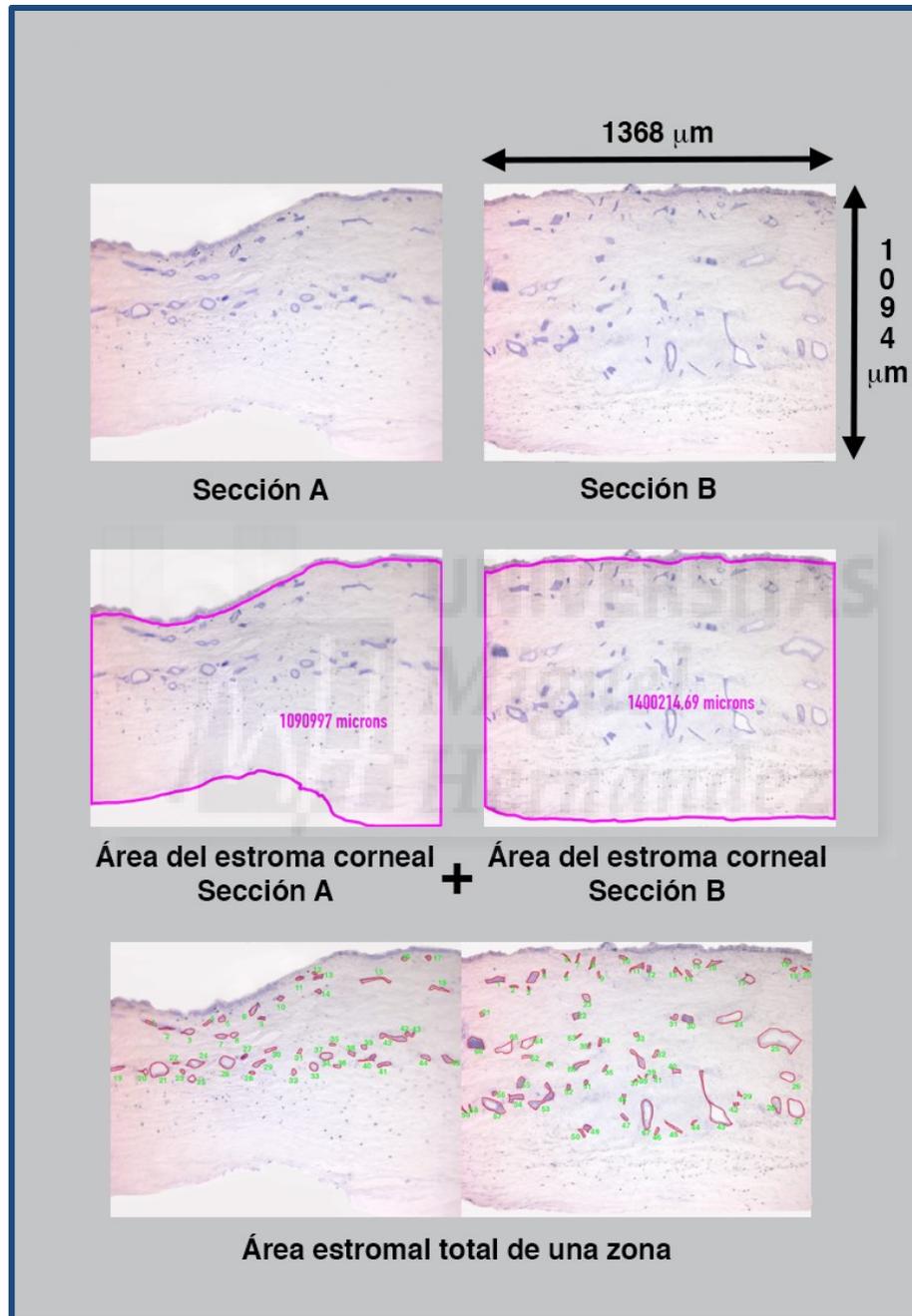


Figura 3.13. Estudio de la microdensidad vascular y análisis de la sección de los vasos. El área de estroma corneal a estudio de cada zona se calcula sumando el estroma corneal de las dos secciones de cada zona. El estudio de la microdensidad vascular se realiza respecto al área estromal total de cada una de las zonas de estudio (Zona 1 y Zona 2) de la córnea.

De cada zona de la córnea se analizaron los vasos y, para ello, de cada vaso, aplicando las funciones del programa informático, se calculó el diámetro medio, anchura, perímetro y área de cada vaso. Para el cálculo de la microdensidad vascular de cada zona se midió el número de vasos/mm², el área vascular/mm², y el porcentaje de ésta última respecto al estroma corneal estudiado (Tabla 3.6.)

ANÁLISIS DE LOS VASOS	MICRODENSIDAD VASCULAR
Diámetro	Nº Vasos/mm ² Área/mm ²
Longitud	
Anchura	
Perímetro	
Área	

Tabla 3.6. Análisis cuantitativo de los vasos y la microvascularidad.

El diámetro de un capilar es aproximadamente de 5 a 10 μm . Por tanto, para evitar falsos positivos, aquellas estructuras que presentaron una anchura inferior a 5 μm fueron excluidas, ya que la tinción NADPH-diaforasa puede teñir los núcleos de algunas células probablemente implicadas en la respuesta inflamatoria, así como las fibras nerviosas individuales del plexo sub-basal cuyo diámetro varía entre 0,05 y 0,25 μm .

3.9. Anatomía patológica

De cada grupo, los 4 ojos restantes se destinaron para el estudio anatómico-patológico. Las piezas histológicas se incluyeron en parafina obteniéndose cortes de 2 μm .

Se procedió a la tinción mediante hematoxilina-eosina usando un teñidor automático Shandon Varistain Gemini (Thermo Fischer Scientific Incorporated, Waltham, MA, USA) (Tabla 3.7).

H&E
1) Estufa durante 20 minutos a 60°.
2) Introducción en xilol para eliminar el exceso de parafina (15 minutos).
3) Uso de alcoholes en concentración decreciente para hidratar la muestra (alcohol absoluto 100° durante 2 minutos y alcohol 96° durante 2 minutos).
4) Lavado de las piezas con agua destilada (2 minutos).
5) tinción con hematoxilina de Harris (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemania), de naturaleza básica, para teñir estructuras ácidas (6 minutos); lavado con agua (3 minutos).
6) Tinción con solución de eosina al 1% (Panreac, Barcelona, España), de naturaleza ácida, diluida al 50% en agua destilada para teñir componentes básicos (4 minutos).
7) Deshidratación de la muestra mediante alcoholes, esta vez, en concentración creciente (alcohol 96° durante 2 minutos y alcohol 100° durante 2 minutos).
8) Inclusión en xilol (durante 2 minutos) antes de realizar el montaje y la preparación.

Tabla 3.7. Pasos para la tinción de H&E

Se utilizó un microscopio óptico (Leika Microsystems Limited Heerbrugg, Suiza) y se tomaron imágenes con cámara digital AxioCam ICc 1 de secciones corneales de 2 μm de espesor paralelas al limbo del área cubierta por suturas con una separación de 50 μm entre ellas.

Se analizaron descriptivamente los cambios histológicos más relevantes en cuanto a la disposición de las suturas y cambios estructurales de las suturas, la infiltración inflamatoria, la distribución de los neovasos corneales en el estroma corneal, etc.

3.10. Evaluación de los efectos secundarios oculares

Los posibles efectos secundarios oculares se evaluaron en lámpara de hendidura los días 7 y 14 del estudio. Los efectos adversos hallados fueron registrados y, en caso necesario, se procedió a su registro fotográfico y medición. Se valoró el segmento anterior del ojo prestando especial atención a la hiperemia conjuntival, epitelio patía corneal, cambios en el iris y en el cristalino, y reacción celular en cámara anterior. Esta última se evaluó observando el número de células inflamatorias en un haz de luz de alta intensidad de 1 x 3 mm. También se registró la presencia o ausencia de depósitos farmacológicos sobre las estructuras del segmento anterior. Así mismo, el último día del estudio se exploró el fondo de ojo mediante oftalmoscopia indirecta.

3.11. Análisis estadístico

Para el cálculo del tamaño muestral nos hemos basado en nuestro estudio previo: "Pérez Santonja JJ, Campos-Mollo E, Lledó Riquelme M, Javaloy J., Alió J. *Inhibition of corneal neovascularization by topical bevacizumab (anti-VEGF) and sunitinib (anti-VEGF and anti-PDGF) in an animal model. American Journal Ophthalmology 2010; 150: 519-528e1*" [223]. En este estudio el tamaño muestral fue de 12 conejos por grupo.

El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Se realizaron pruebas estadísticas paramétricas, una vez que la distribución normal de los datos fue verificada mediante el procedimiento de Kolmogorov-Smirnov. Las representaciones gráficas se elaboraron con el programa Microsoft Office Excel 2011 (Microsoft corporation, Los Angeles, CA; USA).

Análisis de las dimensiones básicas del ojo de conejo

Primeramente, se realizó un análisis descriptivo de las dimensiones básicas del ojo de conejo. Para evaluar si existían diferencias entre los distintos grupos se usó el análisis de la varianza de un factor (ANOVA de 1 factor).

Análisis de las superficies de neovascularización corneal

Se analizaron los cambios de las SNVC a lo largo del tiempo para cada grupo mediante el test de la t de Student para muestras relacionadas. Las diferencias entre los grupos en puntos de tiempo específicos fueron evaluadas usando el análisis de la varianza de 1 factor (ANOVA de 1 factor). La homogeneidad de las varianzas de los grupos en el ANOVA de 1 factor se determinó mediante el estadístico de Levene. Cuando las varianzas fueron similares, para la realización de comparaciones múltiples pareadas entre los grupos se empleó el test de Tukey. Cuando las varianzas fueron desiguales, se utilizó el test de Tamhane.

Análisis de la microdensidad vascular

Se realizó un estudio descriptivo de las dimensiones básicas de la sección de la totalidad de los vasos de cada grupo (diámetro medio, perímetro, longitud y anchura).

Se comparó entre los distintos grupos la media del área de sección de los vasos (ASV) y las diferencias en la microdensidad vascular empleando el análisis de la varianza de 1 factor (ANOVA de 1 factor).

Los cambios del ASV y de la microdensidad vascular entre la zona proximal al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2) se analizaron para cada grupo usando el test de la t de Student para muestras relacionadas.

Mediante el test de Correlación de Pearson se evaluó la asociación entre el tamaño de los vasos y el área vascular de cada sección.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue $< 0,05$

4.

RESULTADOS

4.1. DIMENSIONES BÁSICAS DEL OJO DE CONEJO Y ÁREAS DE ESTÍMULO ANGIOGÉNICO

La Tabla 4.1. muestra las dimensiones básicas del ojo de conejo que incluye los diámetros horizontal, vertical y medio, el radio corneal y la profundidad de cámara anterior para cada grupo.

A partir de las dimensiones básicas del ojo del conejo se calculó la superficie corneal total para cada uno de los grupos. No existieron diferencias significativas entre las medias de la superficie corneal total de los distintos grupos ($137,98 \pm 5,94 \text{ mm}^2$; $139,09 \pm 3,97 \text{ mm}^2$; $141,11 \pm 6,52 \text{ mm}^2$; $137,32 \pm 3,28 \text{ mm}^2$; $135,42 \pm 2,09 \text{ mm}^2$ y $139,21 \pm 4,09 \text{ mm}^2$ para el grupo A, B, C, D, E y F respectivamente; ANOVA de un factor, $p = 0,071$) (Tabla 4.1).

El área media cubierta por las suturas también se muestra en la Tabla 4.1 para cada grupo. Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos respecto al área cubierta por suturas ($27,29 \pm 2,99 \text{ mm}^2$ para el grupo A; $28,57 \pm 1,37 \text{ mm}^2$ para el grupo B; $26,47 \pm 1,32 \text{ mm}^2$ para el grupo C; $26,12 \pm 2,60 \text{ mm}^2$ para el grupo D, $27,79 \pm 2,17 \text{ mm}^2$ para el grupo E y $27,61 \pm 2,18 \text{ mm}^2$ para el grupo F; ANOVA de 1 factor $p = 0,89$).

Estos resultados demostraron que las dimensiones de las superficies corneales totales fueron similares para todos los grupos antes del tratamiento y además, que la cantidad de estímulo para inducir una respuesta neovascular en la córnea también fue similar en todos los grupos experimentales.

	Grupo A Suero salino n =12	Grupo B Vatalanib 0,4 mg/ml n =12	Grupo C Vatalanib 3,5 mg/ml n =12	Grupo D Axitinib 0,02 mg/ml n=12	Grupo E Axitinib 0,35 mg/ml n =12	Grupo F Axitinib 0,5 mg/ml n=12	Total n=72
Diámetro horizontal (mm)	12,98 ± 0,19	13,00 ± 0,23	13,02 ± 0,17	12,89 ± 0,12	12,79 ± 0,14	12,91 ± 0,26	12,93 ± 0,20
Diámetro vertical (mm)	12,08 ± 0,30	12,10 ± 0,19	12,24 ± 0,42	12,00 ± 0,30	12,04 ± 0,09	12,12 ± 0,16	12,09 ± 0,27
Diámetro medio (mm)	12,53 ± 0,20	12,55 ± 0,20	12,63 ± 0,25	12,44 ± 0,16	12,41 ± 0,09	12,52 ± 0,14	12,51 ± 0,19
Radio medio (mm)	6,26 ± 0,10	6,27 ± 0,10	6,31 ± 0,12	6,22 ± 0,08	6,20 ± 0,04	6,26 ± 0,07	6,25 ± 0,09
Profundidad de la cámara anterior (mm)	2,14 ± 0,20	2,20 ± 0,11	2,22 ± 0,20	2,22 ± 0,16	2,13 ± 0,08	2,25 ± 0,14	2,19 ± 0,15
Superficie corneal total (mm ²)	137,98 ± 5,94	139,09 ± 3,97	141,11 ± 6,52	137,32 ± 3,28	135,42 ± 2,09	139,21 ± 4,09	138,36 ± 4,75
Área cubierta por suturas (mm ²)	27,29 ± 2,99	28,57 ± 1,37	26,47 ± 1,32	26,12 ± 2,60	27,79 ± 2,17	27,61 ± 2,18	27,23 ± 2,24

Tabla 4.1. Dimensiones medias básicas del ojo de conejo.

4.2. SUPERFICIES DE NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL (SNVC)

4.2.1. Análisis de los grupos

Las superficies de neovascularización corneal (SNVC) de cada grupo, medidas sobre las fotografías calibradas realizadas los días 7 y 14 del estudio, y expresadas en mm² y en porcentaje respecto al ACS (superficie de estímulo) y a la superficie total de la córnea, se muestran en la Tabla 4.2 y Tabla 4.3 respectivamente.

	Grupo A Suero sa- lino n =12	Grupo B Vatalanib 0,4 mg/ml n =12	Grupo C Vatalanib 3,5 mg/ml n =12	Grupo D Axitinib 0,02 mg/ml n =12	Grupo E Axitinib 0,35 mg/ml n =12	Grupo F Axitinib 0,5 mg/ml n=12	ANOVA de 1 fac- tor
SNVC (mm ²)	19,10 ± 4,38	11,15 ± 2,68	6,22 ± 2,33	10,44 ± 4,99	4,42 ± 2,08	2,88 ± 1,66	p < 0,001
% del área neo- vascular res- pecto del área cubierta por su- turas (ACS)	70,01 ± 13,96	37,81 ± 8,69	24,42 ± 8,97	39,74 ± 18,17	15,94 ± 7,23	10,35 ± 5,69	p < 0,001
% del área neo- vascular res- pecto de la su- perficie total de la córnea	13,90 ± 3,34	8,00 ± 1,80	4,41 ± 1,63	7,60 ± 3,61	3,26 ±1,51	2,05 ±1,14	p < 0,001
Relación de In- hibición	0%	41,62%	67,43%	45,34%	76,85%	84,92%	

Tabla 4.2. Superficies medias de neovascularización corneal mediante lámpara de hendidura en el día 7 (Media ± DS) en términos de mm² y en porcentaje respecto al ACS y a la superficie total de la córnea. Relación de inhibición de la SNVC expresada en mm² respecto al grupo control.

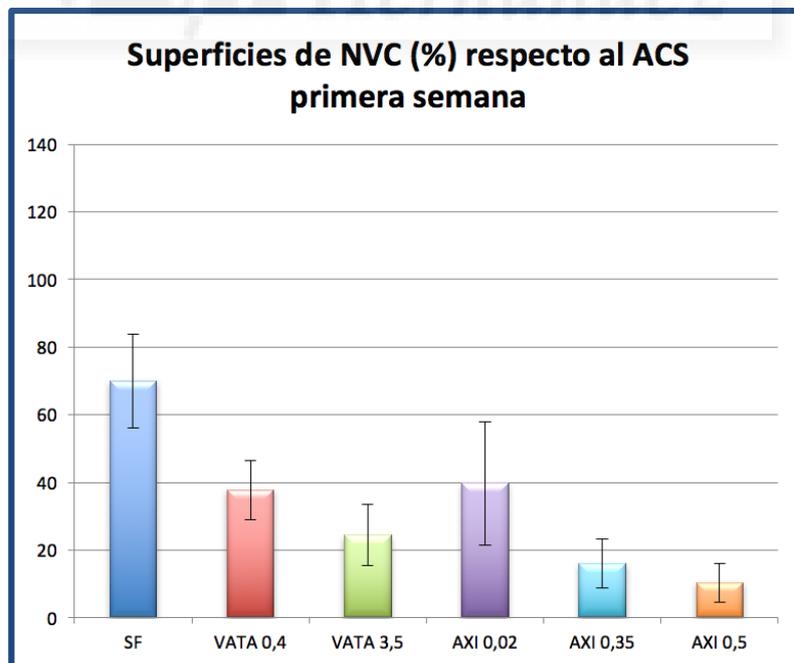


Figura 4.1. Superficies medias de neovascularización corneal en el día 7 medidas en las fotografías biomicroscópicas y expresadas en porcentaje (Media ± DS) respecto al ACS.

	Grupo A Suero sa- lino n =12	Grupo B Vatalanib 0,4 mg/ml n =12	Grupo C Vatalanib 3,5 mg/ml n =12	Grupo D Axitinib 0,02 mg/ml n =12	Grupo E Axitinib 0,35 mg/ml n =12	Grupo F Axitinib 0,5 mg/ml n=12	ANOVA De 1 fac- tor
SNVC (mm ²)	31,50 ± 7,47	21,80 ± 6,32	12,22 ± 5,16	19,20 ± 8,92	8,83 ± 3,92	5,12 ± 3,97	p < 0,001
% del área neovascular respecto del área cubierta por suturas (ACS)	115,00 ± 22,55	73,66 ± 19,44	47,95 ± 20,19	73,89 ± 34,98	31,90 ± 13,59	18,38 ± 13,75	p < 0,001
% del área neovascular respecto de la superficie total de la córnea	22,93± 5,77	15,60 ± 4,17	8,66 ± 3,62	14,01 ± 6,63	6,52 ± 2,86	3,63 ± 2,74	p < 0,001
Relación de Inhibición	0%	30,79%	61,20%	39,04%	71,96%	83,74%	

Tabla 4.3. Superficies medias de neovascularización corneal mediante lámpara de hendidura en el día 14 (Media ± DS) en términos de mm² y en porcentaje respecto al ACS y a la superficie total de la córnea. Relación de inhibición de la SNVC expresada en mm² respecto al grupo control.

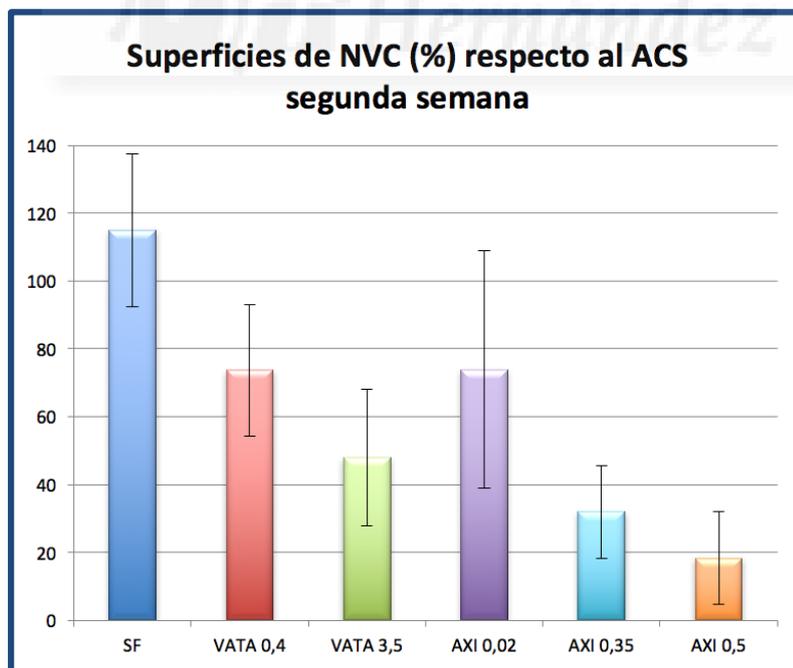


Figura 4.2. Superficies medias de neovascularización corneal en el día 14 medidas en las fotografías biomicroscópicas y expresadas en porcentaje (Media ± DS) respecto al ACS.

Grupo A: Suero fisiológico (Grupo control)

En el séptimo día, el grupo A (suero fisiológico) presentó una superficie media de NV corneal de $19,10 \pm 4,38 \text{ mm}^2$ constituyendo el $70,01 \pm 13,96 \%$ del ACS (Figura 4.3). En la segunda semana la SNVC aumentó hasta $31,50 \pm 7,47 \text{ mm}^2$ ($115,00 \pm 22,55 \%$ del ACS). Estos resultados demostraron el crecimiento continuo de los neovasos durante el seguimiento y que catorce días fueron suficientes para que los neovasos alcanzasen toda el área de estímulo (ACS) (Figura 4.4).



Figura 4.3. Medición de la SNVC en fotografía calibrada a color (izquierda) y aneritra (derecha) en el día 7 después de iniciar el tratamiento en el grupo de suero fisiológico. Los vasos sobrepasan la primera hilera de suturas.

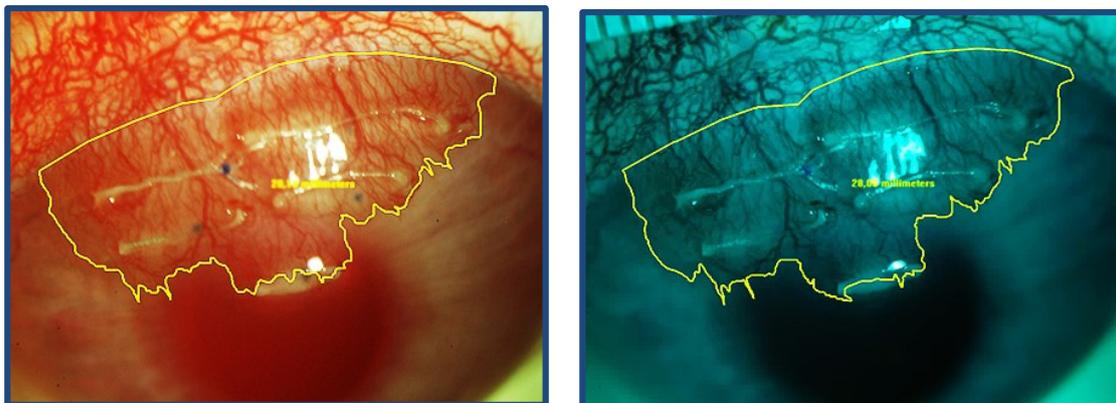


Figura 4.4. Medición de la SNVC en fotografía calibrada a color (izquierda) y aneritra (derecha) en el día 14 después de iniciar el tratamiento en el grupo de suero fisiológico. Los neovasos cubren toda el ACS (área de estímulo).

Grupo B: Vatalanib 0,4 mg/ml

En el séptimo día, el grupo B mostró una SNVC de $11,15 \pm 2,68 \text{ mm}^2$, representando el $37,81 \pm 8,69 \%$ del ACS (Figura 4.5). Esta superficie neovascular también aumentó durante la segunda semana hasta $21,80 \pm 6,32 \text{ mm}^2$ cubriendo sólo el $73,66 \pm 19,44 \%$ del ACS. Los resultados indican que, a pesar del incremento de la SNVC durante todo el seguimiento, a los 14 días sólo el 73,66 % del área de estímulo estaba cubierta por tejido neovascular (Figura 4.6).

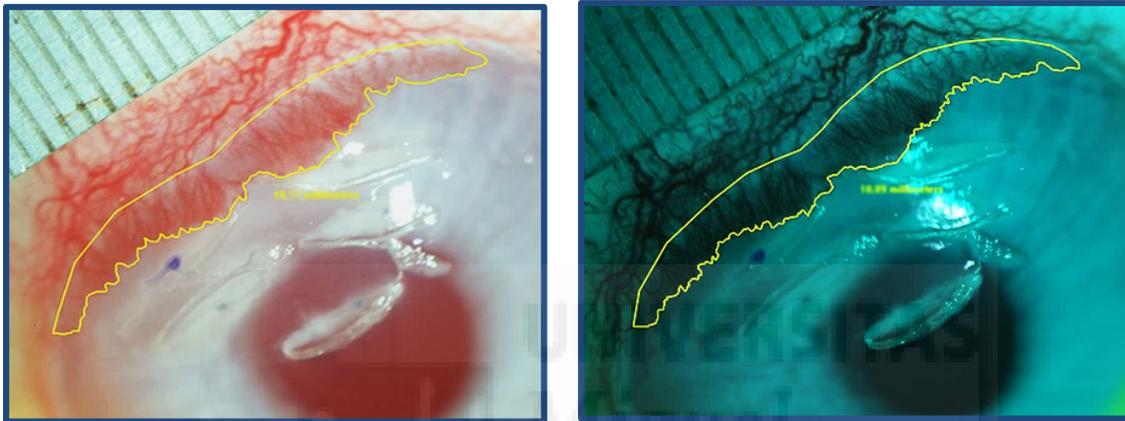


Figura 4.5. Medición de la SNVC en el día 7 después del tratamiento con vatalanib 0,4 mg/ml.

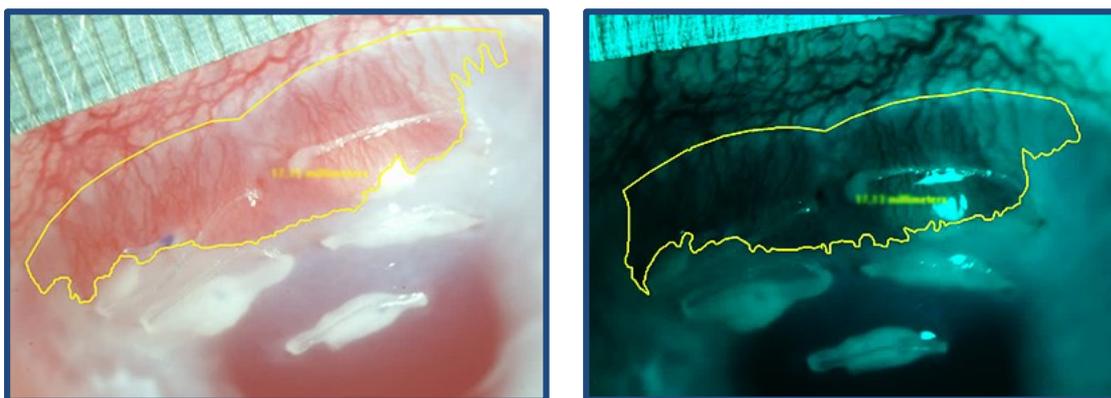


Figura 4.6. Medición de la SNVC en el día 14. Inhibición de la neovascularización después de la administración de vatalanib 0,4 mg/ml. El tejido neovascular sobrepasa la primera hilera de suturas.

Grupo C: Vatalanib 3,5 mg/ml

En el grupo C, la SNVC en el séptimo día fue de $6,22 \pm 2,33 \text{ mm}^2$, representando el $24,42 \pm 8,97 \%$ del ACS (Figura 4.7.). En el día 14, la SNVC se incrementó hasta $12,22 \pm 5,16 \text{ mm}^2$ ($47,95 \pm 20,19 \%$ del ACS)



Figura 4.7. Medición de la SNVC en el día 7 después del tratamiento con vatalanib 3,5 mg/ml.

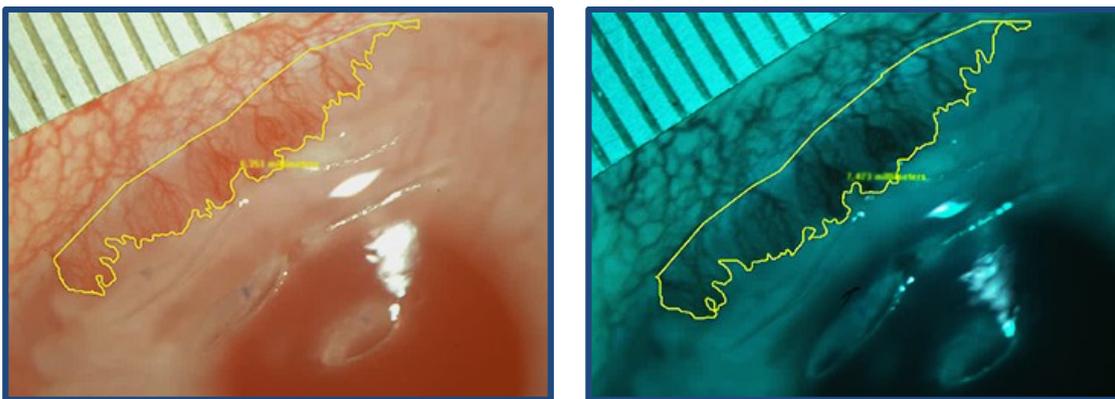


Figura 4.8. Medición de la SNVC en el día 14 en el grupo del vatalanib 3,5 mg/ml. La neovascularización corneal es anterior a la primera hilera de suturas.

Grupo D: Axitinib 0,02 mg/ml

En el grupo D, la SNVC después de la primera semana de tratamiento fue de $10,44 \pm 4,99 \text{ mm}^2$ representando el $39,74 \pm 18,17 \%$ del ACS (Figura 4.9). En el día 14, el área neovascular corneal había aumentado hasta $19,20 \pm 8,92 \text{ mm}^2$ alcanzando el $73,89 \pm 34,98 \%$ del ACS (Figura 4.10).

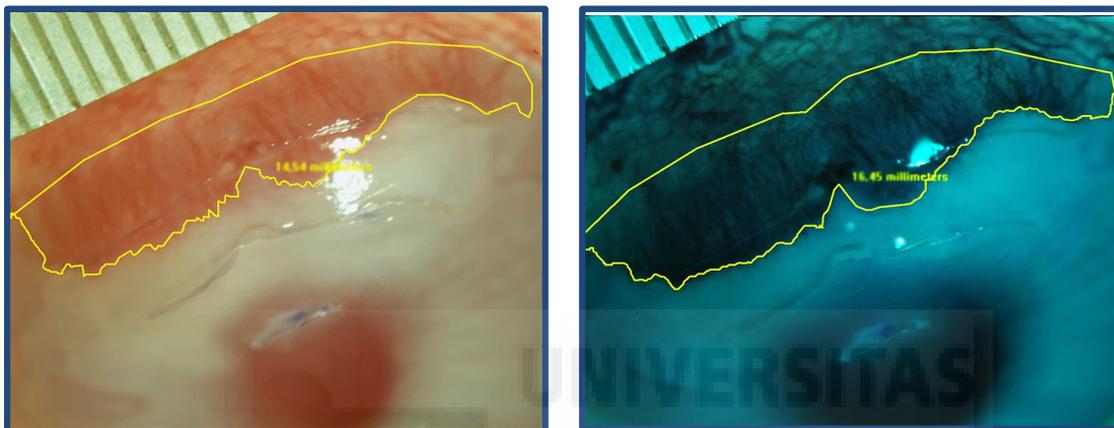


Figura 4.9. Medición en el día 7 después del tratamiento con axitinib 0,02 mg/ml. La neovascularización supera la primera hilera de suturas.



Figura 4.10. Medición en el día 14 después del tratamiento con axitinib 0,02mg/ml. La neovascularización se extiende alcanzando la segunda hilera de suturas.

Grupo E: Axitinib 0,35 mg/ml

Al séptimo día, el grupo E mostró una SNVC de $4,42 \pm 2,08 \text{ mm}^2$ representando el $15,94 \pm 7,23 \%$ del ACS (Figura 4.11). En el día 14, el área neovascular también aumentó hasta $8,83 \pm 3,92 \text{ mm}^2$ ($31,90 \pm 13,59 \%$ del ACS) (Figura 4.12).

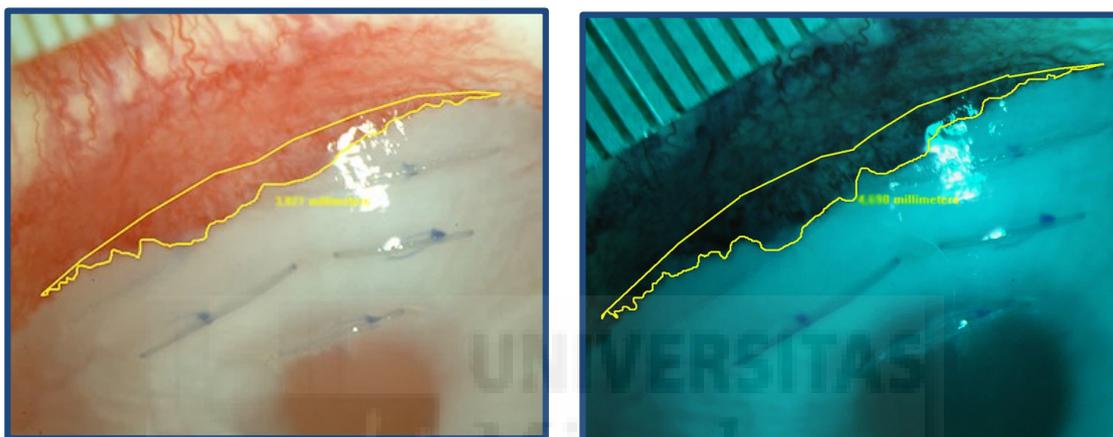


Figura 4.11. Medición de la SNVC en el día 7 después del tratamiento con axitinib 0,35 mg/ml.

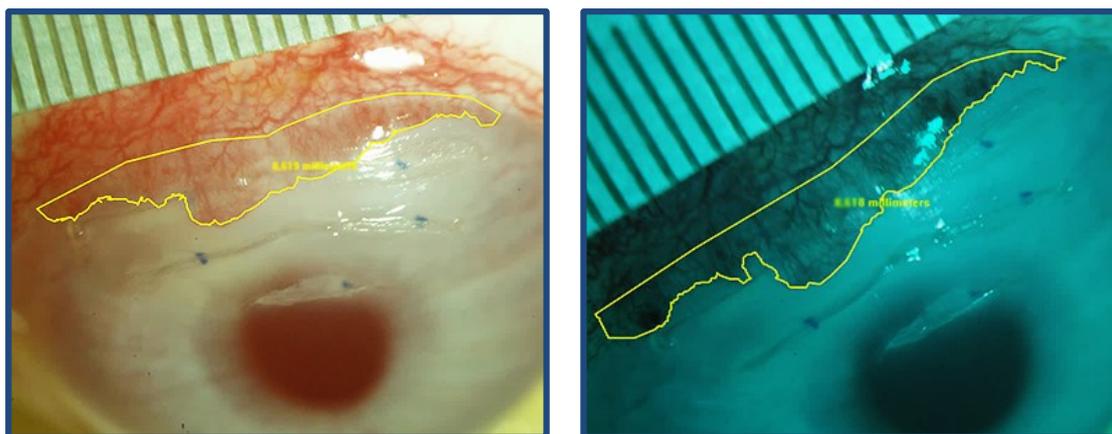


Figura 4.12. Medición de la SNVC en el día 14 después del tratamiento con axitinib 0,35 mg/ml

Grupo F: Axitinib 0,5 mg/ml

En el grupo F, la SNVC después de la primera semana de tratamiento fue de $2,88 \pm 1,66 \text{ mm}^2$ representando el $10,35 \pm 5,69 \%$ del ACS (Figura 4.13). En el día 14, el área neovascular corneal había aumentado hasta $5,12 \pm 3,97 \text{ mm}^2$ alcanzando el $18,38 \pm 13,65 \%$ del ACS. La SNVC también aumentó durante el periodo de seguimiento, sin embargo, tan sólo el 18,38% del área de estímulo se hallaba cubierta por los neovasos en el día 14 (Figura 4.14).

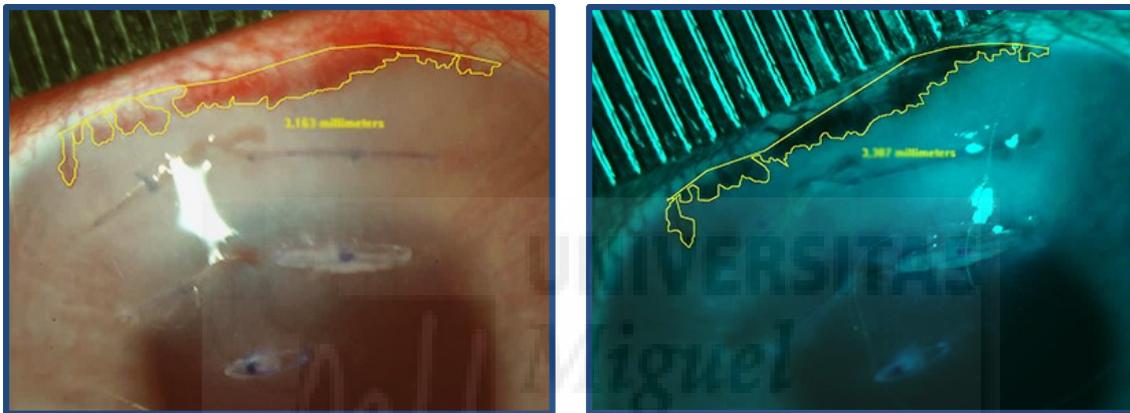


Figura 4.13. Medición de la SNVC en el día 7 después del tratamiento con axitinib 0,5 mg/ml.

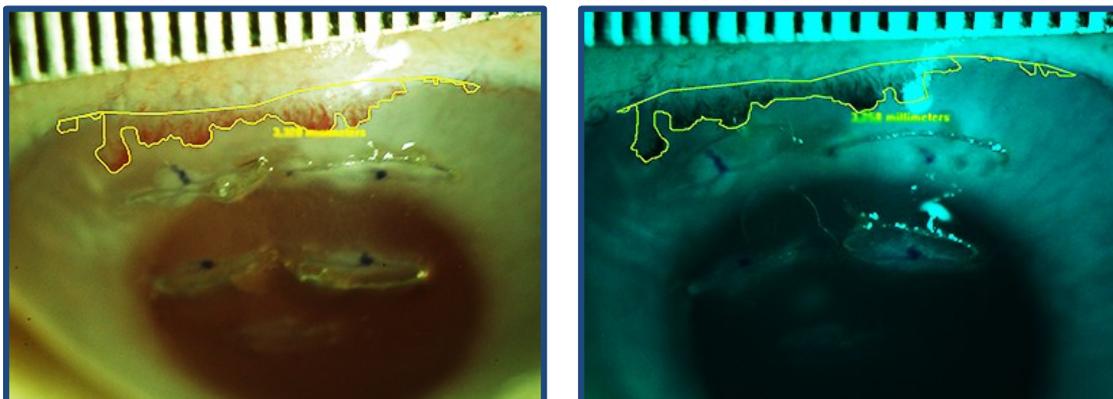


Figura 4.14. Medición de la SNVC en el día 14 después del tratamiento con axitinib 0,5 mg/ml.



Figura 4.15. Proporción área vascularizada/área avascular respecto al área de estímulo representada por el ACS para cada uno de los grupos.

4.2.2. Diferencias de crecimiento neovascular entre la primera y la segunda semana

Para analizar los cambios en el crecimiento de los neovasos durante la primera y segunda semana se comparó la SNVC a los 7 días con la variable resultante de la diferencia entre la SNVC a los 7 días y a los 14 días medida en mm^2 .

Tal como se muestra en la Tabla 4.4, no hubo diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los vasos entre la primera y la segunda semana en todos los grupos farmacológicos excepto en el Grupo 1. Paradójicamente, en el Grupo 1 (Suero fisiológico) el crecimiento de los vasos durante la segunda semana fue menor que durante la primera ($p < 0,001$). Esto hecho se produce porque durante la primera semana el estímulo de las suturas es tan intenso que los vasos superan más de la mitad del área cubierta por las mismas quedando un área menor para cubrir la segunda semana (Figura 4.16).

CRECIMIENTO POR SEMANA	Grupo A Suero salino Control n =12	Grupo B Vatalanib 0,4 mg/ml n =12	Grupo C Vatalanib 3,5 mg/ml n =12	Grupo D Axitinib 0,02 mg/ml n =12	Grupo E Axitinib 0,35 mg/ml n =12	Grupo F Axitinib 0,5 mg/ml n=12
1ª semana (mm ²)	19,10 ± 4,38	11,15 ± 2,68	6,22 ± 2,33	10,44 ± 4,99	4,42 ± 2,08	2,88 ± 1,66
2ª semana (mm ²)	12,39 ± 4,45	10,65 ± 4,37	6,00 ± 3,04	8,75 ± 5,03	4,41 ± 2,37	2,23 ± 2,67
Diferencia entre la 1ª y 2ª semana (mm ²)	6,71 ± 4,71 (p < 0,001)	0,5 ± 3,57 (p = 0,634)	0,22 ± 1,64 (p = 0,650)	1,69 ± 1,31 (p = 0,224)	0,65 ± 2,02 (p = 0,985)	2,23 ± 2,67 (p = 0,284)
Crecimiento de neovasos de la 2ª semana respecto a la 1ª semana	-35,13%	-4,48% (no significativo)	-3,53% (no significativo)	- 16,18% (no significativo)	-0,22% (no significativo)	- 22,56% (no significativo)

Tabla 4.4. Crecimiento semanal medio de los neovasos durante la primera y la segunda semana (Media ± DS; test de Student para muestras relacionadas) en mm² y en porcentaje respecto al ACS; relación del crecimiento respecto a la primera semana medido en mm².

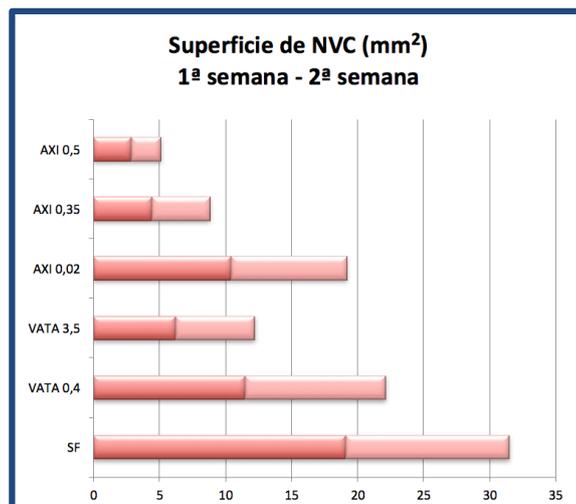


Figura 4.16. Crecimiento semanal medio de los neovasos durante la primera y la segunda semana (Media \pm DS; test de Student para muestras relacionadas) expresada en mm².

4.2.3. Diferencias en la SNVC entre los grupos de vatalanib

En el séptimo día tras el inicio del tratamiento, la SNVC expresada en mm² fue mayor en el grupo A que en los grupos B (ANOVA de un factor, $p < 0,001$) y C ($p < 0,001$). A su vez, la SNVC en el grupo B fue significativamente mayor que en el grupo C ($p = 0,002$). Así pues, en comparación con suero fisiológico, la NV corneal fue inhibida un 41,62% por el vatalanib 0,4 mg/ml y un 67,43% por el vatalanib 3,5 mg/ml tras 7 días de tratamiento (Tabla 4.2).

Catorce días tras el inicio del tratamiento, la SNVC medida en mm² en el grupo A fue también superior a los grupos B (ANOVA de un factor, $p = 0,002$) y C ($p < 0,001$). La SNVC en el grupo B fue también significativamente mayor que en el grupo C ($p = 0,002$). Por tanto, en el día 14, en comparación con el grupo control, la NV corneal fue inhibida un 30,79% por el vatalanib 0,4 mg/ml y un 61,20% por el vatalanib 3,5 mg/ml (Tabla 4.3).

Si expresamos estos datos en porcentaje del ACS en el séptimo día, los neovasos del grupo A cubrieron la superficie de estímulo un 32,20% más que el grupo B (ANOVA de un factor; $p < 0,001$) y un 45,58% más que el grupo C ($p < 0,001$). La superficie neovascular del grupo B también cubrió un 13,38% más del ACS que el grupo C ($p = 0,013$).

Catorce días después del inicio del tratamiento, la SNVC del grupo A cubrió el ACS un 41,33% más que el grupo B (ANOVA de un factor, $p < 0,001$) y un 67,05% más que el grupo C ($p < 0,001$). Además, los neovasos en el grupo B ocuparon un 25,71% más del ACS que el grupo C ($p < 0,001$).

4.2.4. Diferencias en la SNVC entre los grupos de axitinib

En el séptimo día tras el inicio del tratamiento, la SNVC expresada en mm^2 fue mayor en el grupo A que en los grupos D (ANOVA de un factor, $p = 0,001$), E ($p < 0,001$) y F ($p < 0,001$). A su vez, la SNVC en el grupo D fue significativamente mayor que en el grupo E ($p = 0,01$), y este último mayor que el grupo F ($p = 0,01$). Así pues, en comparación con suero fisiológico, la NV corneal fue inhibida un 45,34% por el axitinib de 0,02 mg/ml, un 76,85% por el axitinib de 0,35 mg/ml y un 84,92% por el axitinib de 0,5 mg/ml tras 7 días de tratamiento (Tabla 4.2).

Catorce días tras el inicio del tratamiento, la SNVC medida en mm^2 en el grupo A fue también superior a los grupos D (ANOVA de un factor, $p = 0,009$), E ($p < 0,001$) y F ($p < 0,001$). La SNVC en el grupo D fue también significativamente mayor que en el grupo E ($p = 0,013$) y este último, a su vez, fue mayor que el grupo F pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,172$). En el día 14, en comparación con el grupo control, la NV corneal fue inhibida un 39,04% por el axitinib de 0,02 mg/ml, un 71,96% por el axitinib de 0,35 mg/ml y un 83,74% por el axitinib de 0,5 mg/ml (Tabla 4.3).

Si expresamos estos datos en porcentaje del ACS en el séptimo día, los neovasos del grupo A cubrieron la superficie de estímulo un 30,26% más que el grupo D (ANOVA de un factor; $p < 0,001$), un 54,07% más que el grupo E ($p < 0,001$) y un 59,65% más que el grupo F ($p < 0,001$). La superficie neovascular del grupo D también cubrió un 23,80% más del ACS que el grupo E ($p < 0,001$) y un 29,38% más que el grupo F ($p = 0,005$). No hubo diferencias significativas entre el grupo E y F ($p = 0,225$).

Catorce días después del inicio del tratamiento, la SNVC del grupo A cubrió el ACS un 41,11% más que el grupo D (ANOVA de un factor, $p = 0,017$), un 83,10% más que el grupo E ($p < 0,010$) y un 96,62% más que el grupo F ($p = 0,001$). Además, los neovasos en el grupo D ocuparon un 41,99% más del ACS

que el grupo E ($p = 0,001$) y un 55,51% más que el grupo F ($p < 0,001$). Tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre el grupo E y F ($p = 0,136$).

4.2.5. Diferencias entre vatalanib y axitinib de alta concentración

Como se ha descrito en los apartados anteriores, los dos fármacos inhiben de forma significativa la NV corneal respecto a su grupo control. En el séptimo día tras el inicio de tratamiento el grupo de vatalanib 3,5 mg/ml presentó una SNVC medida en mm^2 superior a axitinib 0,5 mg/ml ($p = 0,01$). De hecho, el vatalanib cubrió el ACS un 14,07% más que el axitinib ($p = 0,03$).

A los 14 días las diferencias entre las superficies neovasculares (medidas mm^2) entre ambos grupos persistieron ($p = 0,017$) y la diferencia en el porcentaje del área cubierta por las suturas fue aún mayor: 29,56% ($p = 0,007$).

Por tanto, con toda la información recopilada, podemos afirmar que, a los 7 días de tratamiento, el axitinib 0,5 mg/ml fue 1,25 veces más potente que el vatalanib 3,5 mg/ml. De modo similar, a los 14 días de tratamiento, axitinib 0,5 mg/ml presentó una inhibición de la SNVC 1,36 veces superior al vatalanib 3,5 mg/ml.

4.3. ESTUDIO DE LA MICRODENSIDAD VASCULAR

Para el estudio de microdensidad vascular se seleccionaron 8 ojos de cada grupo. Se estudiaron dos zonas: una zona proximal (Zona 1) localizada entre el limbo y la primera hilera de puntos de sutura y una zona distal (Zona 2) entre la primera y segunda hilera.

Se analizaron un total de 4771 secciones de los vasos distribuidos en los distintos grupos para medir las siguientes variables: diámetro medio, perímetro longitud y anchura. Aquellas estructuras que presentaron una anchura inferior a $5 \mu\text{m}$ fueron excluidas, ya que la tinción NADPH-diaforasa puede teñir los núcleos de algunas células probablemente implicadas en la respuesta inflamatoria, así como las fibras nerviosas individuales del plexo sub-basal cuyo diámetro varía entre $0,05$ y $0,25 \mu\text{m}$. Las dimensiones básicas de los neovasos seccionados se muestran en la Tabla 4.5 que incluyen la zona 1 y 2.

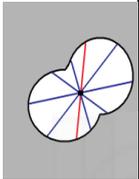
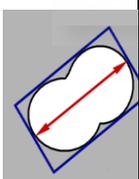
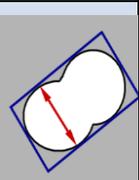
Nº total de secciones Analizadas: 4771		Suero fisiológico	Vatalanib 0,4 mg/ml	Vatalanib 3,5 mg/ml	Axitinib 0,02 mg/ml	Axitinib 0,35 mg/ml	Axitinib 0,5 mg/ml
Número de secciones de vasos analizadas		1893	718	507	953	331	369
Promedio de los diámetros medios de los vasos (µm)		24,27 ± 17,67	21,90 ± 13,08	23,96 ± 15,86	20,74 ± 14,05	31,37 ± 24,19	22,67 ± 14,73
Perímetro medio de los vasos (µm)		99,81 ± 84,91	87,24 ± 67,28	100,12 ± 66,82	86,02 ± 69,35	155,35 ± 114,7	95,60 ± 76,69
Longitud media de los vasos (µm)		41,20 ± 35,97	36,78 ± 29,02	42,93 ± 28,98	34,60 ± 28,33	74,58 ± 51,27	38,48 ± 30,73
Anchura		17,14 ± 11,74	15,39 ± 8,55	15,08 ± 8,58	14,87 ± 9,58	7,44 ± 10,43	21,11 ± 14,32

Tabla 4.5. Dimensiones básicas de todos los neovasos seccionados para todos los grupos a los 14 días de tratamiento (incluye zona 1 y 2).

4.3.1. Comparación del área de sección de los vasos

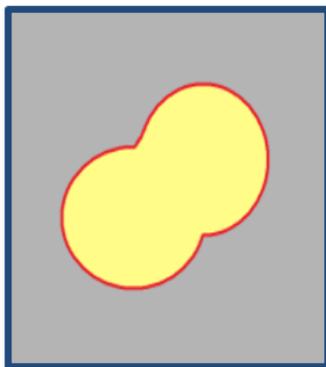


Figura 4.17. Esquema representativo del área de la sección de los vasos.

Para analizar el área de sección de los vasos (ASV; Figura 4.17) entre los distintos grupos, se compararon las medias y las medianas del ASV medidos en las secciones histológicas de cada conejo más próximas al limbo (Zona 1). No se compararon las secciones distales al limbo (Zona 2) porque muchos conejos tratados con IRTQs no presentaban neovasos o un número de vasos tan reducido que podía producir sesgos importantes en el cálculo de la media y mediana del ASV para cada conejo e inducir resultados erróneos. La comparación de las medias y medianas (ANOVA de 1 factor) se muestran en la Tabla 4.6. y 4.7 respectivamente. Al comparar las medias no se observaron diferencias significativas del ASV entre los grupos. La media puede estar desplazada por los valores extremos, sobre todo por los vasos de mayor calibre. Por ello, en este caso, nos ofrece una información más valiosa la mediana del ASV para cada conejo que representa el valor que ocupa el lugar central de todas las ASV cuando son ordenadas de menor a mayor. Teniendo en consideración este hecho, las medianas muestran valores algo menores, no obstante, tampoco se objetivaron diferencias significativas en el ASV entre los distintos grupos.

	Suero fisiológico	Vatalanib 0,4 mg/ml	Vatalanib 3,5 mg/ml	Axitinib 0,02 mg/ml	Axitinib 0,35 mg/ml	Axitinib 0,5 mg/ml	ANOVA
Media del área de sección de los vasos (μm^2)	617,28 ± 201,22	458,35 ± 203,95	443,73 ± 217,14	571,36 ± 257,19	321,73 ± 216,83	434,32 ± 223,91	P=0,108

Tabla 4.6. Comparación de las áreas medias de la sección de los vasos para todos los grupos a los 14 días de tratamiento en la Zona 1.

	Suero fisiológico	Vatalanib 0,4 mg/ml	Vatalanib 3,5 mg/ml	Axitinib 0,02 mg/ml	Axitinib 0,35 mg/ml	Axitinib 0,5 mg/ml	ANOVA
Mediana del área de sección de los vasos (μm^2)	308,41 ± 132,84	320,24 ± 86,13	331,14 ± 174,88	295,70 ± 70,72	194,17 ± 131,61	306,05 ± 201,61	P=0,505

Tabla 4.7. Comparación de las medianas de la sección de los vasos para todos los grupos a los 14 días de tratamiento en la Zona 1.

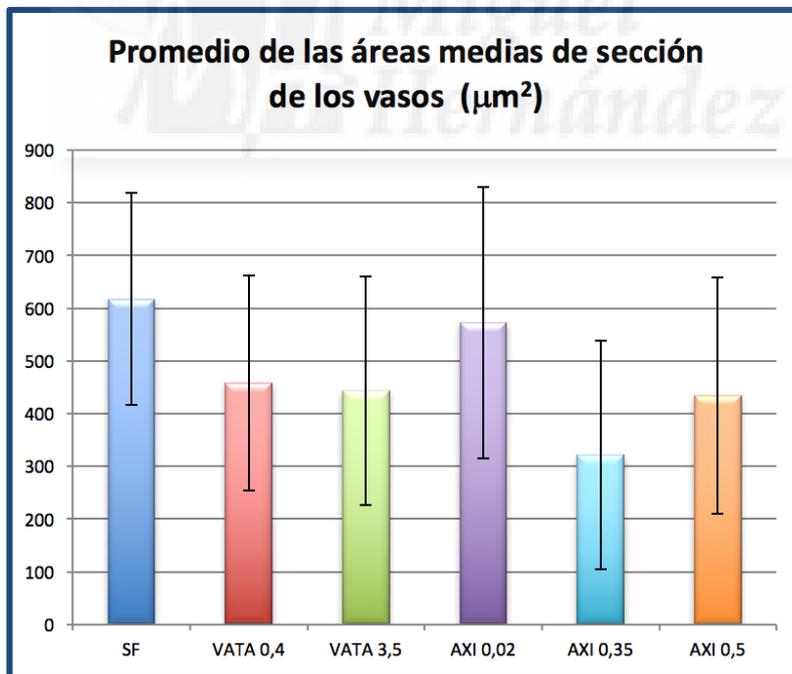


Figura 4.18. Promedio de las áreas medias de la sección los vasos para todos los grupos a los 14 días de tratamiento en la zona 1.

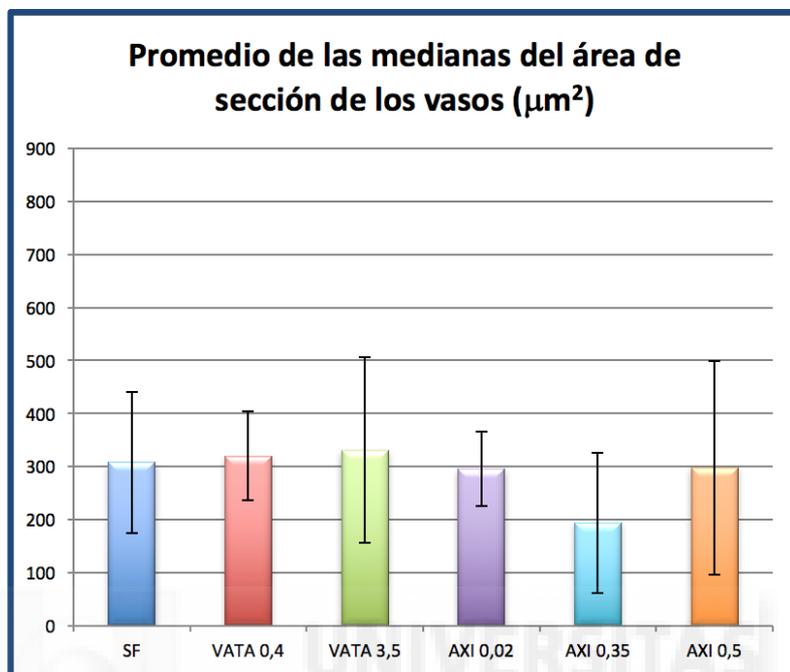


Figura 4.19. Promedio de las medianas de la sección los vasos para todos los grupos a los 14 días de tratamiento en la zona 1.

4.3.2. Comparación de la microdensidad vascular: número de vasos/ mm^2 y porcentaje de área vascular

Los datos comparativos de la microdensidad vascular expresados como número de vasos/ mm^2 y porcentaje del área vascularizada respecto al área de estroma corneal estudiado para la Zona 1 y Zona 2 en cada grupo se muestra en la Tabla 4.8 y Tabla 4.9, respectivamente. Mediante la Correlación de Pearson se evaluó si existía asociación entre el número de vasos y el ASV, resultando fuertemente positiva tanto en la zona 1 (0,843; $p < 0,001$) como en la Zona 2 (0,886; $p < 0,001$). Por tanto, el ASV se encuentra directamente influenciado por el número de vasos.

	MICRODENSIDAD VASCULAR: NÚMERO DE VASOS/mm ²						ANOVA
	Suero fisiológico	Vatalanib 0,4 mg/ml	Vatalanib 3,5 mg/ml	Axitinib 0,02 mg/ml	Axitinib 0,35 mg/ml	Axitinib 0,5 mg/ml	
ZONA 1	55,25 ± 14,05	27,71 ± 33,02	19,18 ± 7,64	22,26 ± 9,75	22,42 ± 19,83	19,70 ± 31,00	P=0,001
ZONA 2	45,09 ± 26,51	14,23 ± 11,91	1,94 ± 3,75	17,12 ± 15,01	0,52 ± 1,15	0,13 ± 0,00	P= <0,001

Tabla 4.8. Datos de la microdensidad vascular expresada en número de vasos/mm² de la zona próxima al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2) para todos los grupos.

El número de vasos por mm² de estroma corneal seccionado representa la densidad de población vascular. Si comparamos los valores de los distintos grupos los conejos del grupo control presentan un mayor número de vasos/mm² que los conejos tratados con IRTQs tanto en la Zona 1 ($p \leq 0,039$) como en la Zona 2 ($p \leq 0,02$). Sin embargo, al comparar las medias entre los distintos grupos tratados con diferentes IRTQs, no se observan diferencias significativas ($p \geq 0,99$ en Zona 1; $p \geq 0,162$ en Zona 2). Por tanto, podemos afirmar que los IRTQs reducen el número de vasos respecto al grupo control.

	MICRODENSIDAD VASCULAR: PORCENTAJE DE ÁREA VASCULAR						ANOVA
	Suero fisiológico	Vatalanib 0,4 mg/ml	Vatalanib 3,5 mg/ml	Axitinib 0,02 mg/ml	Axitinib 0,35 mg/ml	Axitinib 0,5 mg/ml	
ZONA 1	3,31 ± 1,38	1,26 ± 0,71	0,8 ± 0,32	1,24 ± 0,72	0,96 ± 0,89	0,80 ± 1,11	P ≤ 0,001
ZONA 2	2,14 ± 0,64	0,52 ± 0,37	0,10 ± 0,17	0,78 ± 0,53	0,24 ± 0,52	0,00 ± 0,00	P ≤ 0,001

Tabla 4.9. Datos de la microdensidad vascular expresada en % del área vascular respecto al área de estroma seccionado de la zona próxima al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2) para todos los grupos.

El porcentaje del área vascular respecto al área de estroma corneal seccionado se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Suma de ASV de todos los vasos}}{\text{Área de estroma corneal de sección}} \times 100$$

El porcentaje de área vascular depende por tanto del ASV y del número de vasos existentes. Así pues, también podemos observar como el porcentaje de área vascular es superior en los conejos del grupo control respecto a los conejos tratados con IRTQs ($p \leq 0,02$ en Zona 1 y $p \leq 0,07$ en Zona 2). Tampoco existieron diferencias significativas al comparar los grupos tratados con los distintos IRTQs.

Es interesante destacar que en ninguno de los conejos del estudio (SF e IRTQs) el porcentaje de área vascular superó el 5% respecto al área de estroma corneal seccionado.

En la Figura 4.20 se muestran los promedios del n° de vasos/mm² en la Zona 1 y Zona 2 para cada uno de los grupos de conejos.

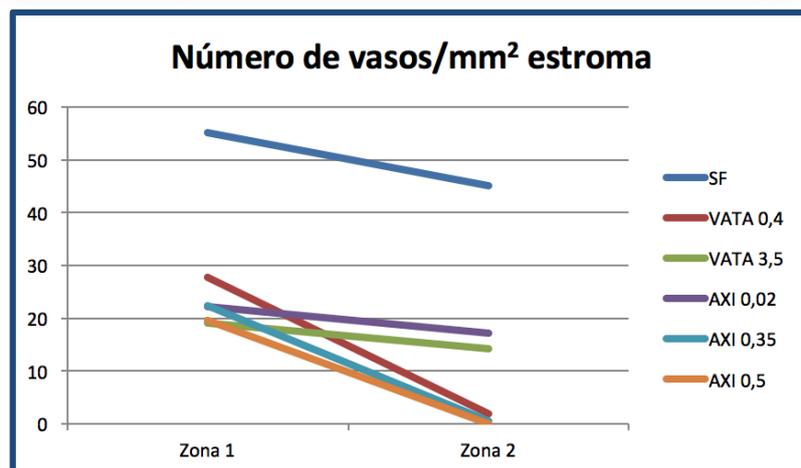


Figura 4.20. Gráfica que muestra para cada grupo el promedio de la microdensidad vascular expresada en n° de vasos/mm² de la zona próxima al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2).

Asimismo, en la Figura 4.21 se muestran los promedios del porcentaje de área vascular respecto al área de estroma corneal seccionado en la Zona 1 y Zona 2 para cada grupo de tratamiento:

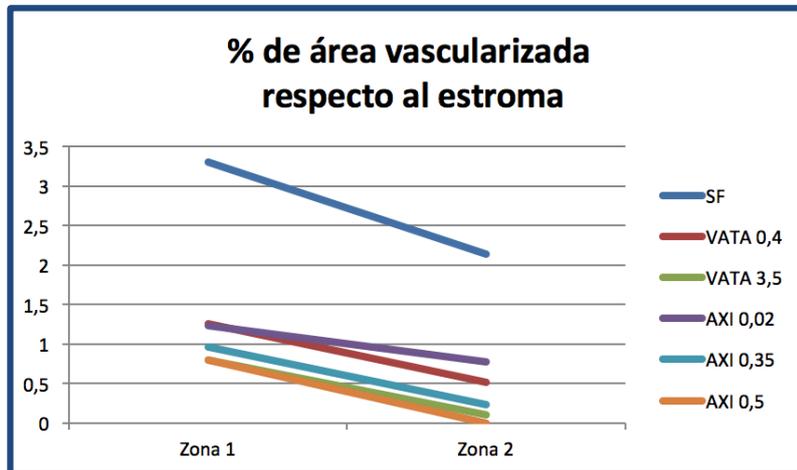


Figura 4.21. Gráfica que muestra para cada grupo el promedio de la microdensidad vascular expresada en porcentaje del área vascular respecto al estroma corneal seccionado de la zona próxima al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2).

En el **grupo A (suero fisiológico)**, el número de vasos/mm² de estroma corneal fue de $55,25 \pm 14,05$ para la Zona 1 y de $45,09 \pm 26,51$ para la Zona 2, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre ambas zonas (t de Student para muestras relacionadas, $p = 0,174$). En cuanto al área de estroma ocupado por tejido vascular (área vascular) en la Zona 1 fue de un $3,31 \pm 1,38$ % y hasta un $2,14 \pm 0,64$ % en la Zona 2, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,07$) (Figura 4.22).

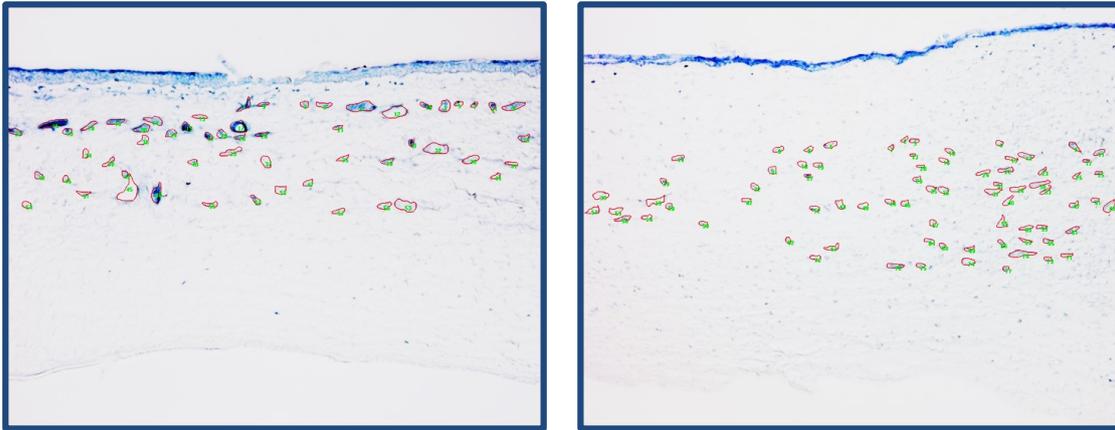


Figura 4.22. Suero fisiológico. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha) teñida mediante la técnica de la NADPH diaforasa (X 100).

En el **grupo B (vatalanib 0,4 mg/ml)**, el número de vasos/mm² de estroma corneal descendió $19,18 \pm 7,64$ (Zona 1) a $14,23 \pm 11,91$ (Zona 2), aunque la diferencia no fue significativa ($p = 0,328$). Tampoco fue significativo el descenso en porcentaje de área vascular entre las dos zonas ($0,8 \pm 0,32 \%$ y $0,52 \pm 0,37 \%$ en la Zona 1 y 2, respectivamente; $p = 0,068$) (Figura 4.23).

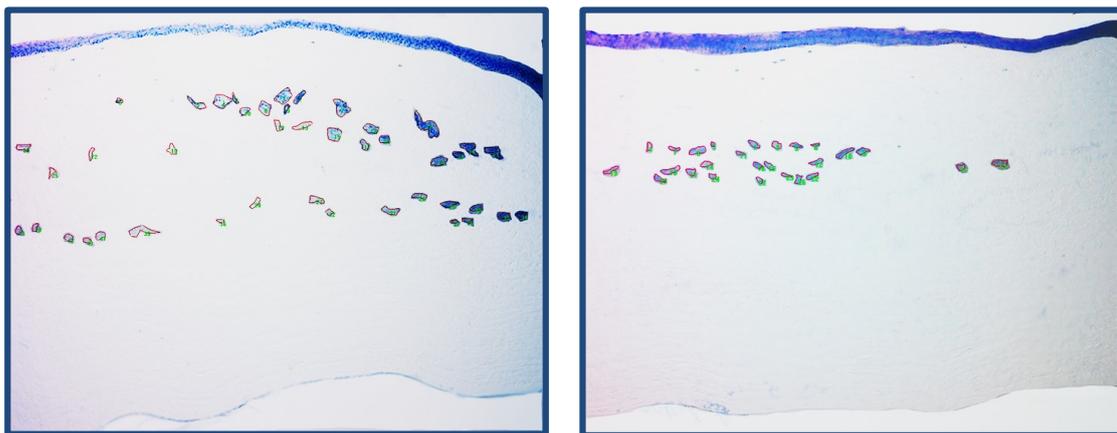


Figura 4.23. Vatalanib 0,4 mg/ml. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).

En el **grupo C (vatalanib 3,5 mg/ml)**, el número de vasos/mm² fue de 27,71 ± 33,02 en Zona 1, descendiendo significativamente hasta un 1,94 ± 3,75, en Zona 2 (test Student para muestras relacionadas, p = 0,01). El porcentaje del área vascular en relación al área estromal fue del 1,26 ± 0,71 % en Zona 1 y también descendió hasta 0,10 ± 0,17% en Zona 2, mostrando diferencias significativas (p=0,01) (Figura 4.24).

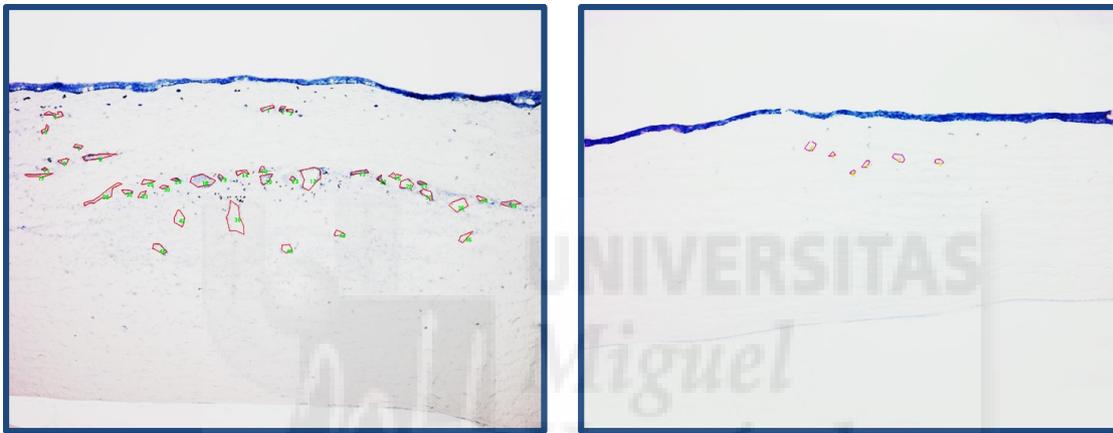


Figura 4.24. Vatalanib 3,5 mg/ml. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).

En el **grupo D (axitinib 0,02 mg/ml)**, el número de vasos/mm² fue de 22,26 ± 9,75 en la Zona 1, descendiendo hasta 17,12 ± 15,01 en la Zona 2, aunque esta diferencia no fue significativa (test t Student para muestras relacionadas, p = 0,227). Tampoco hubo diferencias en cuanto al porcentaje de área vascularizada (1,24 ± 0,72 % en la Zona 1, 0,78 ± 0,53 en la Zona 2; p = 0,08) (Figura 4.25).

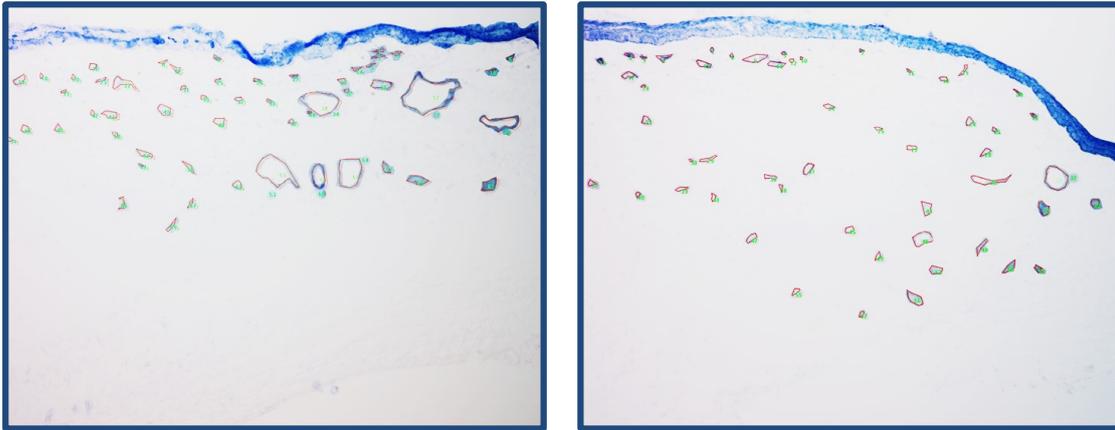


Figura 4.25. Axitinib 0,02. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).

En el grupo E (axitinib 0,35 mg/ml), el número de vasos/mm² fue de $22,42 \pm 19,83$ para la Zona 1 y descendió hasta $0,52 \pm 1,15$ en la Zona 2, existiendo diferencias significativas (test t Student para muestras relacionadas, $p = 0,017$). También fue significativa la disminución del porcentaje del área vascular de la Zona 1 ($0,96 \pm 0,89\%$) en relación a la Zona 2 ($0,24 \pm 0,52\%$; $p = 0,22$) (Figura 4.26).

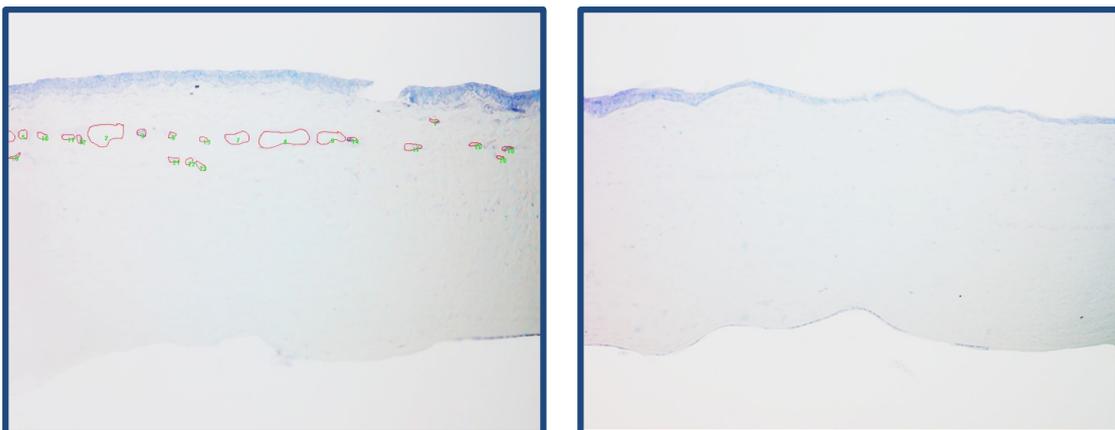


Figura 4.26. Axitinib 0,35 mg/ml. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).

Por último, en el **grupo F (axitinib 0,5 mg/ml)**, en la Zona 1, el número de vasos/mm² fue de $19,79 \pm 31,00$ y el porcentaje de área vascular en relación al área estromal fue de $0,80 \pm 1,11$. En todos los conejos del grupo F la neovascularización no sobrepasó la primera hilera de suturas, por tanto, la Zona 2 no presentó neovasos (test Student para muestras relacionadas, $p < 0,001$ para ambas variables) (Figura 4.27).



Figura 4.27. Axitinib 0,5 mg/ml. Sección corneal en Zona 1 (a la izquierda) y Zona 2 (a la derecha). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).

En cuanto a la comparación de la microdensidad vascular entre las Zonas 1 y 2 para cada grupo podemos resumir que en el grupo control (grupo A, suero fisiológico) y en las concentraciones más bajas de vatalanib y axitinib (Grupo B y grupo D, respectivamente) no se observaron diferencias significativas en el número de vasos y el porcentaje de área vascular entre las zonas más próximas al limbo (Zona 1) y las más distales al limbo (Zona 2). Por otro lado, sí se observaron diferencias significativas en los grupos con concentraciones mayores de fármacos de vatalanib (Grupo C) y de axitinib (Grupo E y F), por lo que podemos concluir que, a estas concentraciones, dichos fármacos presentaron una inhibición de la angiogénesis más eficaz induciendo un gradiente descendente en la respuesta vascular conforme el estímulo se alejaba del limbo.

4.4. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA VASCULAR

La microscopía de las piezas triangulares de tejido corneal teñidas con NADPH diaforasa mostró que, en el grupo control (grupo A; suero fisiológico), las arterias emergentes de las arterias pericorneales estaban representadas por proyecciones ramificadas que tenían un trayecto rectilíneo orientado hacia el punto de sutura (estímulo angiogénico). A medida que el árbol vascular se ramificaba, el calibre uniforme de las arterias fue disminuyendo en la parte distal formando arteriolas y capilares. En las áreas más distales de este plexo vascular de canales anastomóticos de pequeño tamaño se objetivaron las yemas vasculares inmaduras del frente de neovascularización. Los vasos venosos provenientes de las vénulas, se ubicaron en planos algo más profundos presentando un calibre más grueso y una tinción más suave respecto a las arterias. Las venas siguieron un trayecto más irregular y sinuoso hasta desembocar en las venas pericorneales (Figura 4.28).



Figura 4.28. Imagen de la superficie de neovascularización corneal del grupo de suero fisiológico de una muestra tratada mediante tinción enzimática. Se puede observar como las arterias presentan una tinción intensa siguiendo un trayecto rectilíneo con numerosas ramificaciones y las venas se localizan en planos más profundos con una tinción más ténue y un trayecto más sinuoso. Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).

En los grupos tratados con IRTQs se observaron algunas diferencias respecto a la respuesta vascular del grupo control. El árbol vascular, en líneas generales, fue de menor tamaño, aunque no se observaron diferencias significativas en el calibre de los vasos entre los grupos farmacológicos y el grupo control. La respuesta, en muchos casos se limitó a estructuras de aspecto arborescente que estaban constituidas por uno o varios ejes vasculares ramificados. Las ramificaciones que emitía cada eje vascular no presentaban una orientación tan clara hacia el estímulo angiogénico como en el grupo control. En los extremos distales, los vasos mostraron las características propias de capilares con mayor número de anastomosis y pequeños brotes vasculares (Figura 4.29).



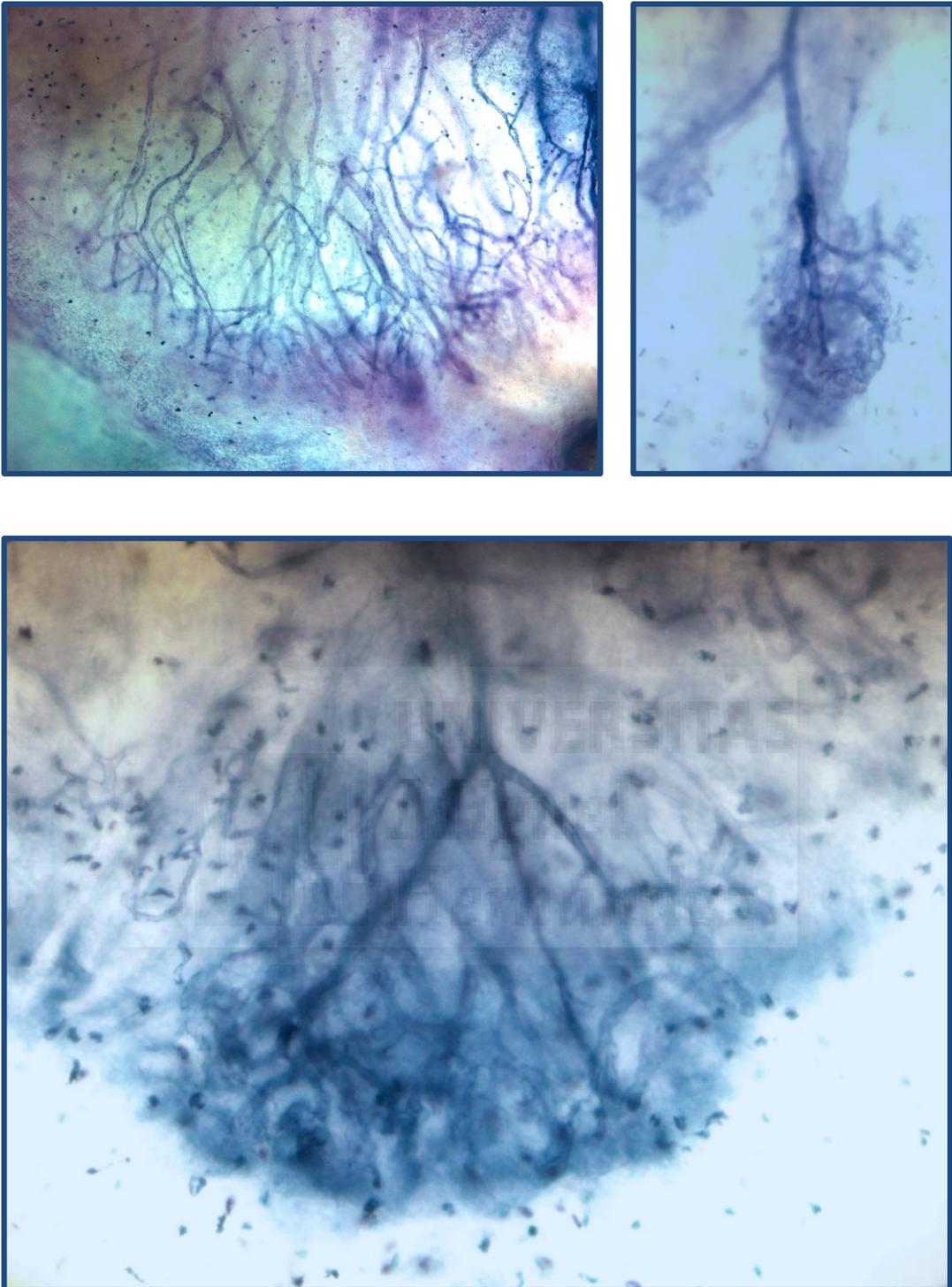


Figura 4.29. Estructuras vasculares con aspecto arborescente en los ojos tratados con IRTQs. Vatalanib (superior izquierda); Axitinib (superior-derecha e inferior). Tinción mediante NADPH diaforasa (X 100).

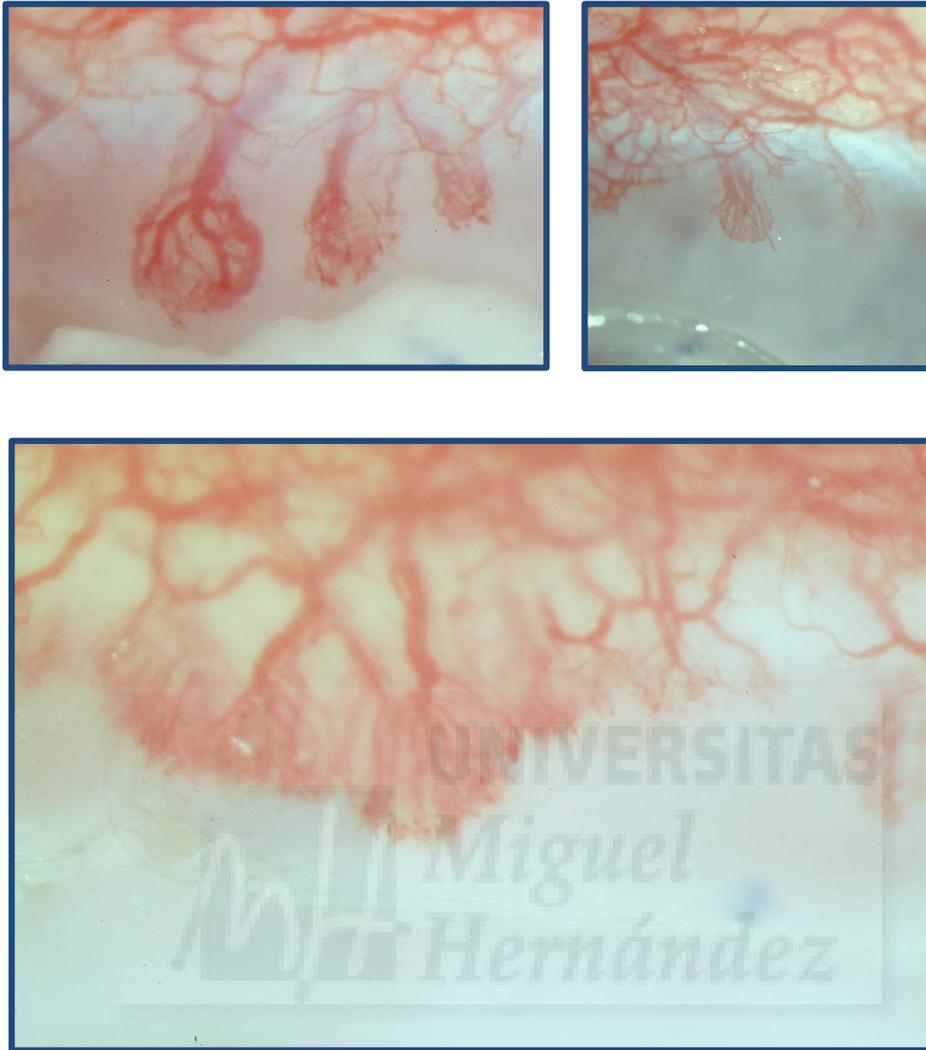


Figura 4.30. Cambios de la morfología vascular en córneas tratadas con axitinib. Pequeñas yemas vasculares que no alcanzan el primer punto de sutura tras el tratamiento con IRTQs. En algunos ojos, a pesar de la intensa inflamación producida por el punto de sutura, se produce una restricción importante de la respuesta vascular (imagen superior izquierda).

La cámara lúcida permitió dibujar los vasos teñidos con NADPH-diaforasa en distintos focos de todo el espesor de la córnea. De este modo, se proyectó en dos dimensiones la arquitectura tridimensional de los neovasos dibujándolos sobre láminas de tamaño DIN A3. Las fotografías de las superficies dibujadas se muestran en las Figura 4.31 - 4.36.

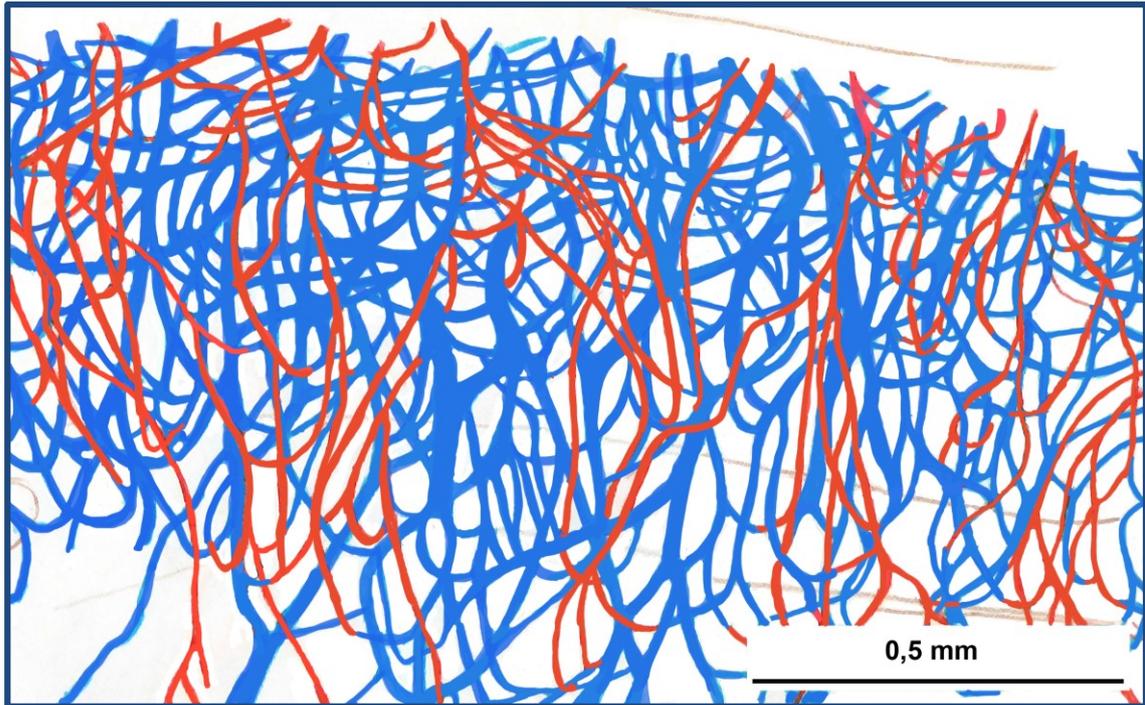


Figura 4.31. Suero fisiológico (cámara lúcida).

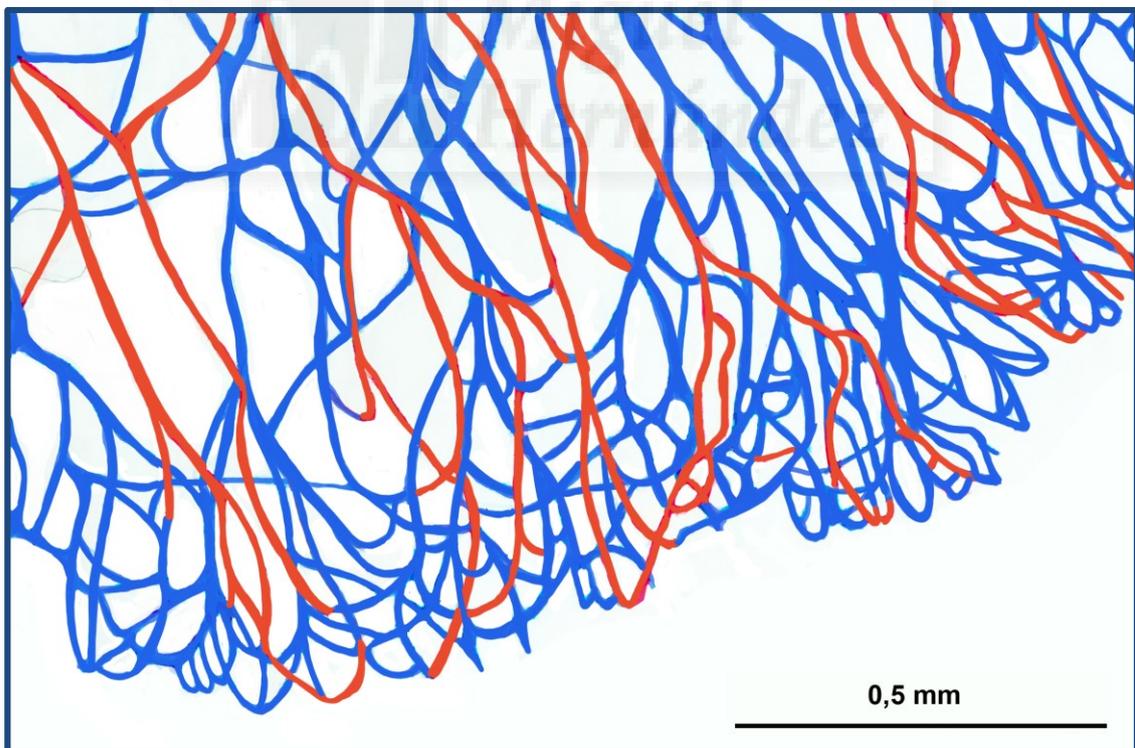


Figura 4.32. Vatalanib 0,4 mg/ml (cámara lúcida).

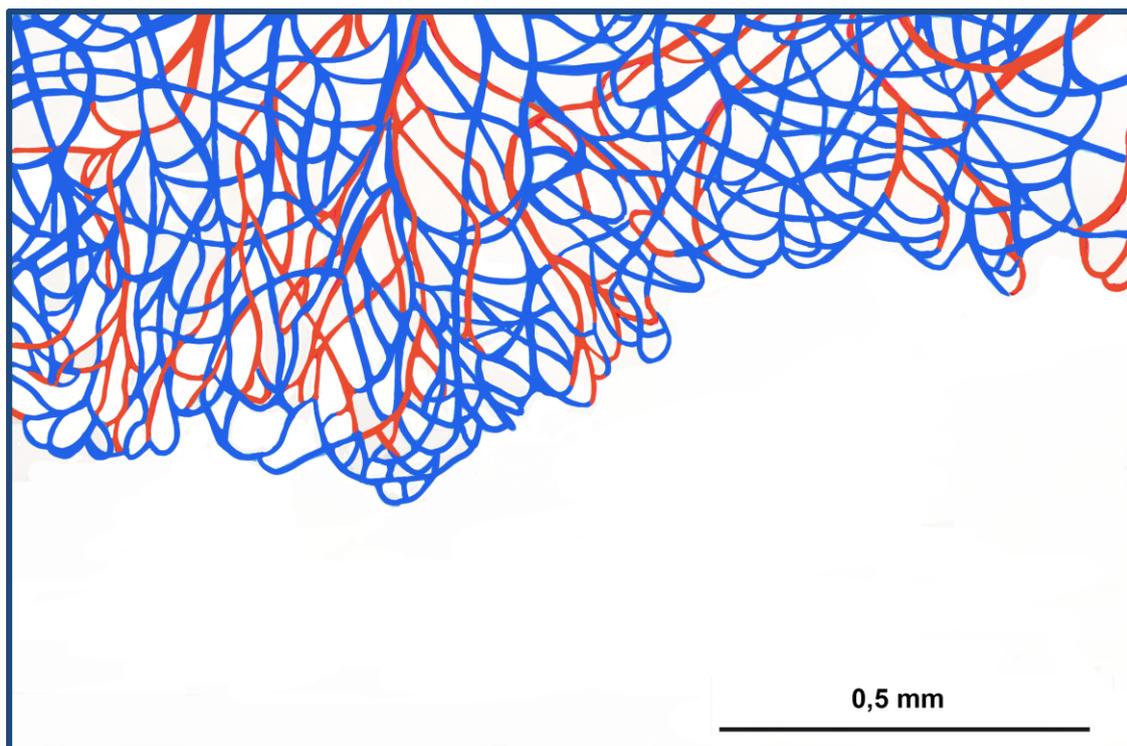


Figura 4.33. Vatalanib 3,5 mg/ml (cámara lúcida).

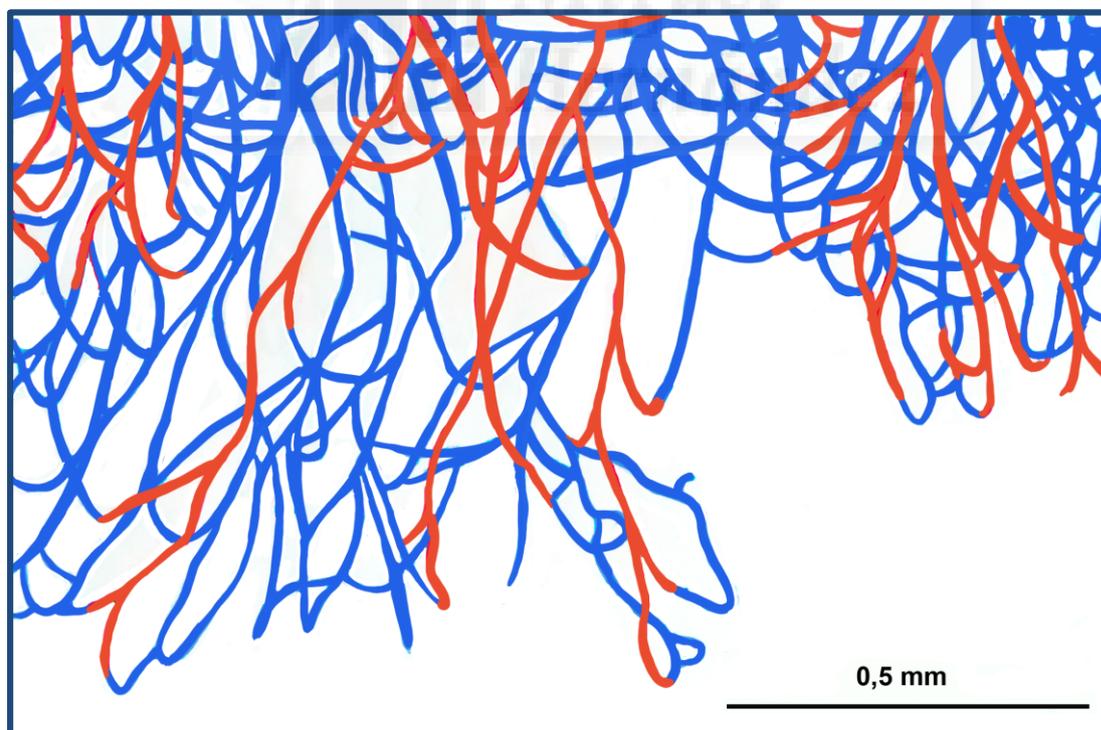


Figura 4.34. Axitinib 0,02 mg/ml (cámara lúcida).

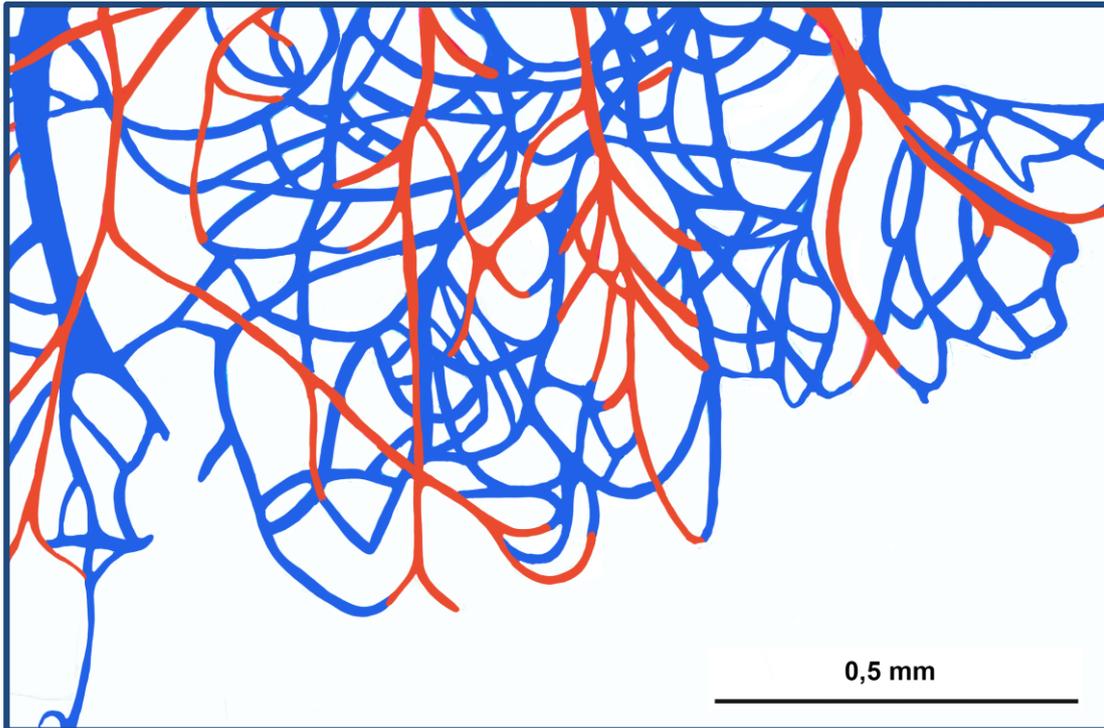


Figura 4.35. Axitinib 0,35 mg/ml (camara lúcida).

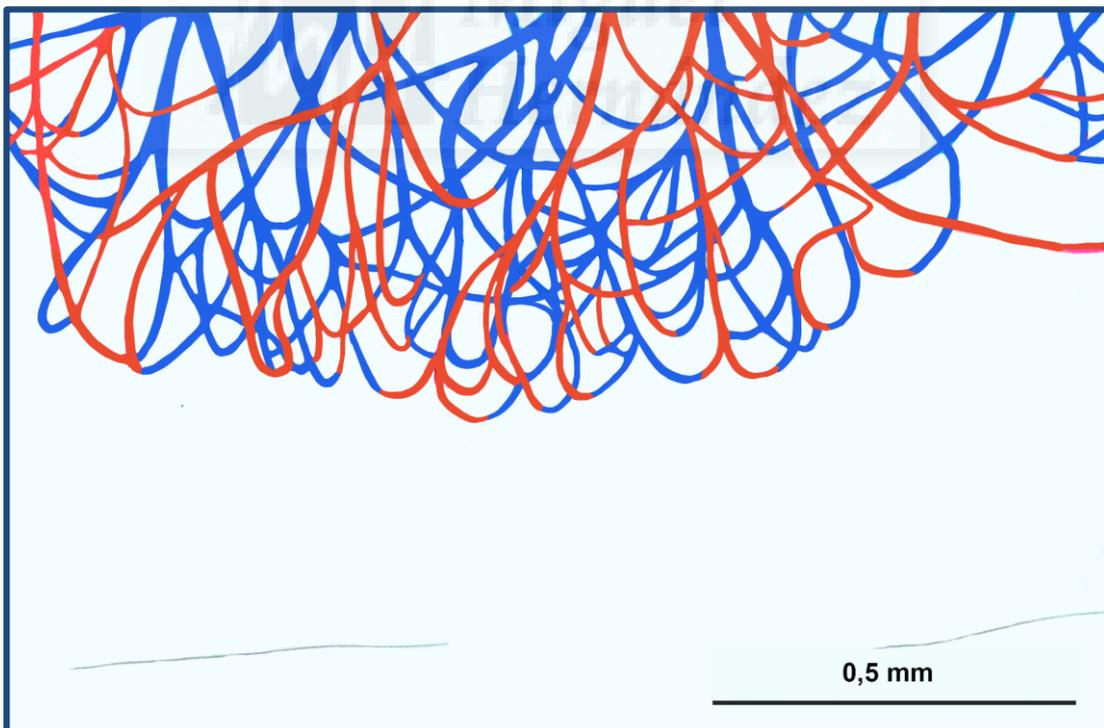


Figura 4.36. Axitinib 0,5 mg/ml (cámara lúcida).

4.5. ANATOMÍA PATOLÓGICA

De cada grupo se procesaron 4 córneas para realizar un estudio anatómico-patológico. Se valoraron las características de los tejidos y se realizó una evaluación de la respuesta inflamatoria producida por las suturas (Figura 4.37).

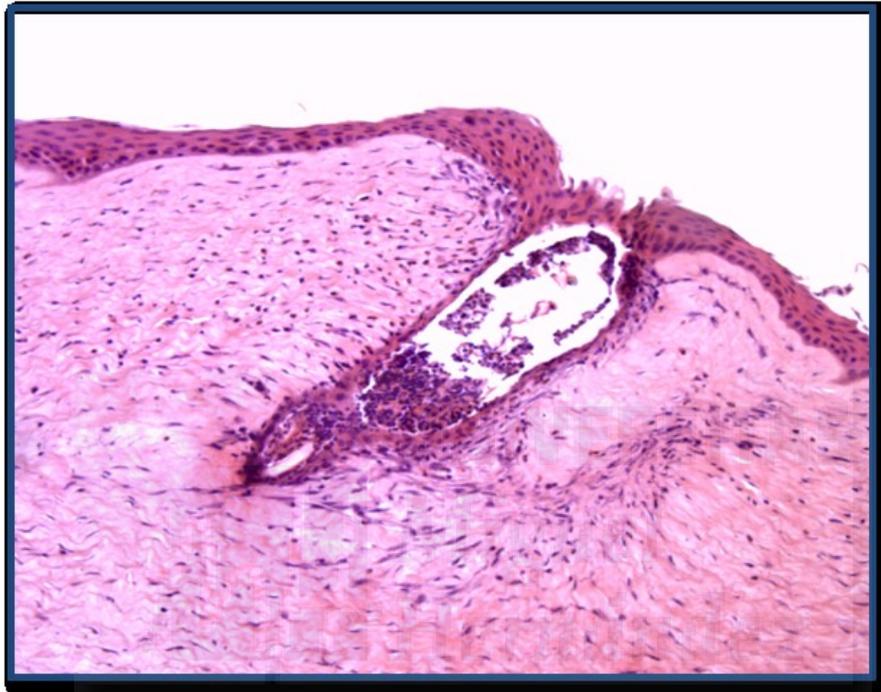


Figura 4.37. Sección de la córnea de conejo a nivel de la salida del punto de sutura. (H&E x 100).

La inflamación es la reacción de un tejido y su microcirculación a la agresión patógena. Se caracteriza por la generación de sustancias inflamatorias y por el movimiento de líquido y células desde la sangre a los tejidos extravasculares. En el grupo control, se produjo una respuesta inflamatoria alrededor de las suturas. Se produjo una inflamación de tipo granulomatosa en la que intervinieron principalmente los linfocitos y los macrófagos. Cuando los macrófagos acumularon sustancias que no pudieron digerir (seda virgen), perdieron su movilidad y se acumularon en el foco de lesión donde sufrieron una modificación característica en su estructura que los transformó en células epitelioides. Los acúmulos de estas células

epiteloides constituyen los granulomas, que son la clave morfológica de la inflamación granulomatosa. Así pues, con la finalidad de rodear el cuerpo extraño, y posteriormente, eliminarlo, se formaron agregados granulomatosos claramente definidos con una acumulación densa de linfocitos, macrófagos y células gigantes.

Las células epiteloides son principalmente secretoras y presentan una menor capacidad macrofágica. Contienen núcleos ovalados con un nucléolo central de gran tamaño y se organizan para formar masas celulares sin apenas dejar espacios entre las células. (Figura 4.38).

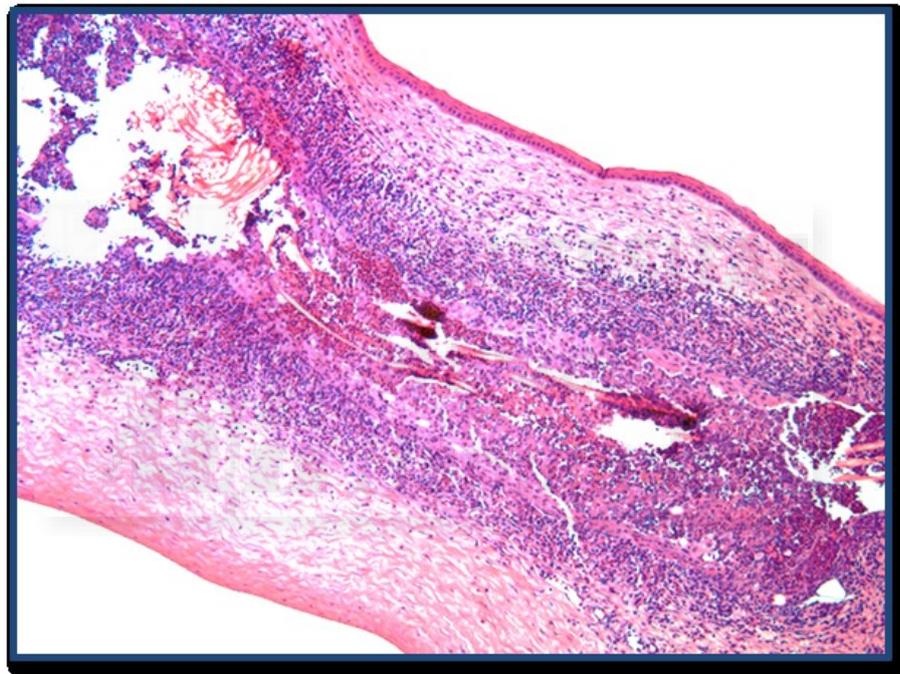


Figura 4.38. El granuloma por reacción a cuerpo extraño está constituido por macrófagos, células epiteloides, células gigantes multinucleadas y un infiltrado linfoplasmocitario. Se puede observar una infiltración de linfocitos y eosinófilos alrededor de las fibras de seda seccionadas transversalmente (H&E x 100).

Con frecuencia las células gigantes se forman por la fusión de los citoplasmas de los macrófagos. Los núcleos de estas células presentaron una distribución irregular (Figura 4.39).

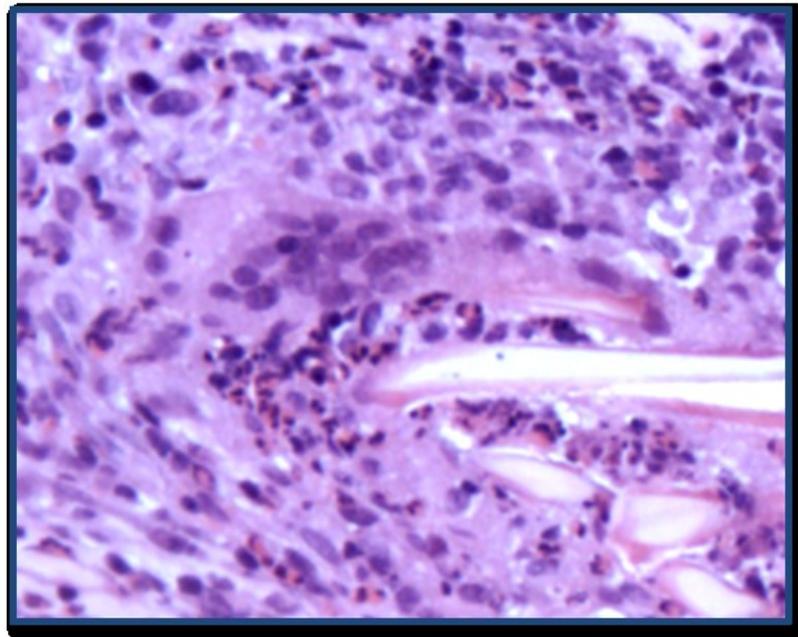


Figura 4.39. Células gigantes multinucleadas. A menudo en el citoplasma de una célula gigante se identificó el agente patógeno, en cuyo caso se utiliza el término de célula gigante de cuerpo extraño. Además, en los granulomas, también se hallaron eosinófilos (H&E x 400).

En los granulomas también se encontraron los demás tipos de células característicos de la inflamación crónica, es decir linfocitos, esinófilos y fibroblastos. En algunas secciones también se hallaron cantidades variables de polimorfonucleares.

En la córnea, los neovasos se dispusieron de forma paralela a los haces de colágeno. Principalmente, los vasos sanguíneos se ubicaron en los dos tercios anteriores del estroma corneal, localizándose en los planos más profundos los vasos de mayor calibre (Figura 4.40). Además, se pudo observar la presencia de pequeños neovasos en el interior de algunos granulomas.

La respuesta de los vasos a la lesión está regulada por mediadores específicos de la inflamación producidos en el foco inflamatorio. Entre estos mediadores se encuentran moléculas vasoactivas que actúan directamente sobre la pared vascular aumentando su permeabilidad. Por ese motivo, algunas córneas mostraron

un edema corneal importante que alteró la estructura de las fibras de colágeno favoreciendo la migración de células inflamatorias del espacio vascular al tejido extravascular. Ya en el tejido, estas células secretan a su vez otros mediadores que potencian o inhiben la respuesta inflamatoria.

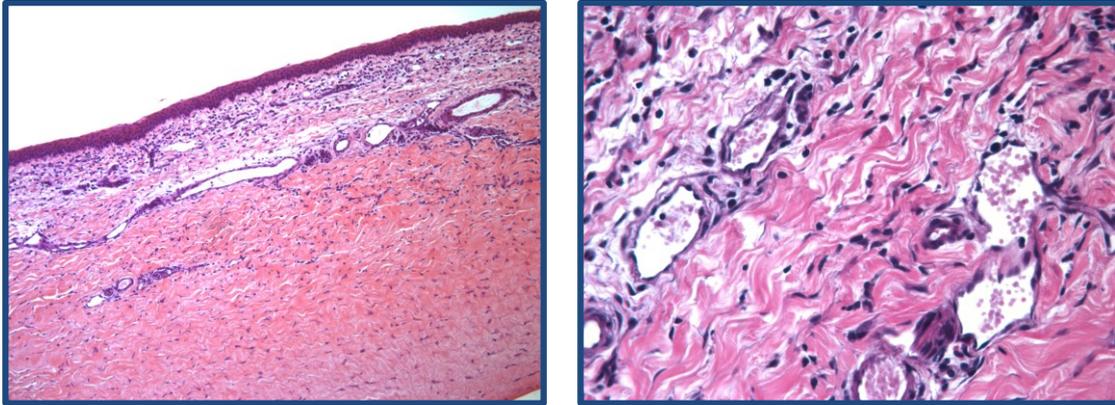


Figura 4.40. Izquierda: Sección longitudinal de un vaso que discurre paralelamente a las fibras de colágeno. Los vasos se distribuyen en los dos tercios anteriores de la córnea (H&E x 100); Derecha: Sección transversal de los vasos con presencia de glóbulos rojos en su interior (H&E x 400).

En aquellos ojos tratados con IRTQs la reacción inflamatoria fue menor, sobre todo en aquellas secciones donde los neovasos no alcanzaron los puntos de suturas más distales al limbo corneal. El aspecto histológico apenas varió entre los distintos grupos tratados con inhibidores de la tirosina quinasa y, por tanto, fue imposible el reconocimiento de un tipo de reacción vascular e inflamatoria específica a nivel cualitativo que permitiera identificar diferencias entre estos grupos de tratamiento (Figura 4.41).

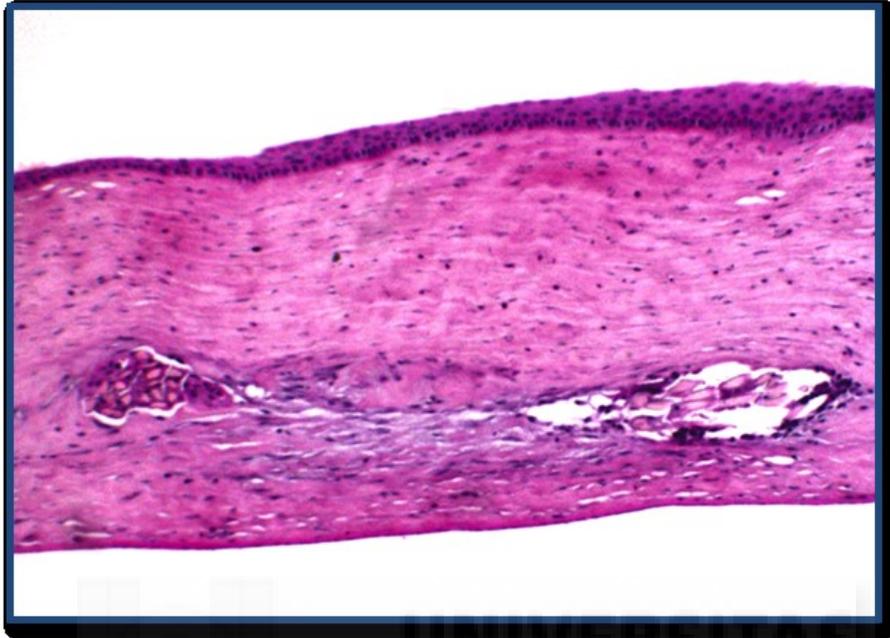


Figura 4.41. Corte histológico a nivel del punto de sutura distal en un conejo tratado con vatalanib donde la neovascularización está inhibida. La infiltración linfoplasmocitaria es menor que en los puntos proximales donde llega la neovascularización (H&E x 40).

A diferencia del grupo control, en el grupo de los ojos tratados con inhibidores de la tirosina quinasa, las secciones corneales mostraron menos cambios en la estructura del estroma con menor edema tisular y un reducido número de neovasos. En los puntos proximales, la reacción inflamatoria se manifestó en forma de granulomas de menor tamaño y más delimitados. Sin embargo, en los puntos distales, apenas se observó reacción inflamatoria y se caracterizó por la ausencia de neovasos (4.42).

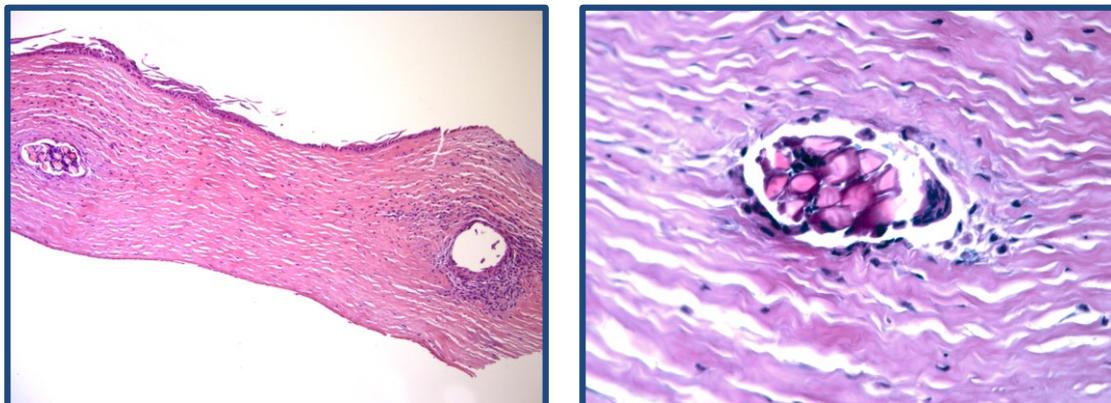


Figura 4.42. Izquierda: mínima reacción inflamatoria en un punto proximal de una córnea de conejo tratada con axitinib. Granuloma pequeño y bien delimitado alrededor de los puntos de sutura (H&E x 100); Derecha: Punto de sutura distal sin infiltración inflamatoria en la córnea de un conejo tratada con axitinib (H&E x 200).

4.6. EFECTOS SECUNDARIOS OCULARES

En ninguno de los grupos, los ojos del conejo presentaron signos de hiperemia conjuntival, epiteliopatía corneal, ni alteraciones del iris o del cristalino los días 7 y 14 del estudio. En algunos conejos de cada grupo, se presentó reacción celular leve en cámara anterior (5-10 cel/1x3 mm de haz) asociada al acto quirúrgico que se resolvió en los días siguientes sin consecuencias. El examen del fondo del ojo fue también normal en todos los grupos.

En los grupos tratados con vatalanib y axitinib no se identificó ningún tipo de depósito sobre la superficie corneal o iridiana al tratarse de fármacos incoloros (figura 4.43).

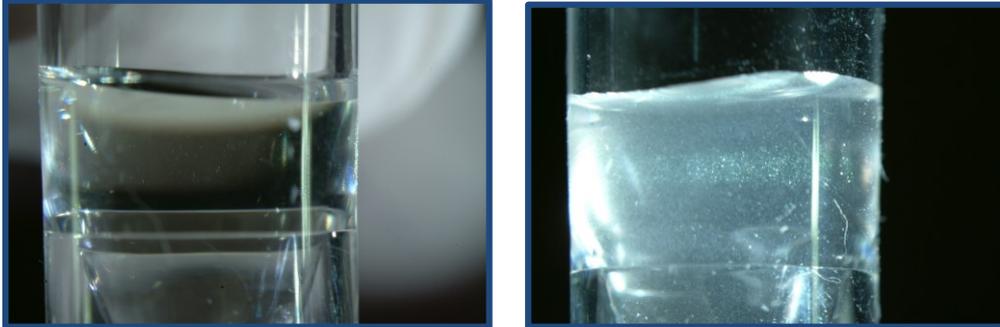


Figura 4.43 Coloración de los inhibidores de los receptores tirosina diluidos en suero fisiológico en la presente tesis doctoral. Izquierda: vatalanib; derecha: axitinib.

En este punto hay que destacar un IRTQ denominado sunitinib que fue objeto de estudio en otros trabajos que hemos publicado anteriormente. Sunitinib es un fármaco de un color amarillo-dorado que producía una tinción amarillenta de la superficie del iris en todos los ojos tratados debido al depósito del fármaco sobre la superficie del iris. Este depósito, fue de carácter transitorio y desapareció tras la suspensión del fármaco. Esto sirvió como trazador para demostrar la penetración de este IRTQ dentro del ojo (figura 4.44).

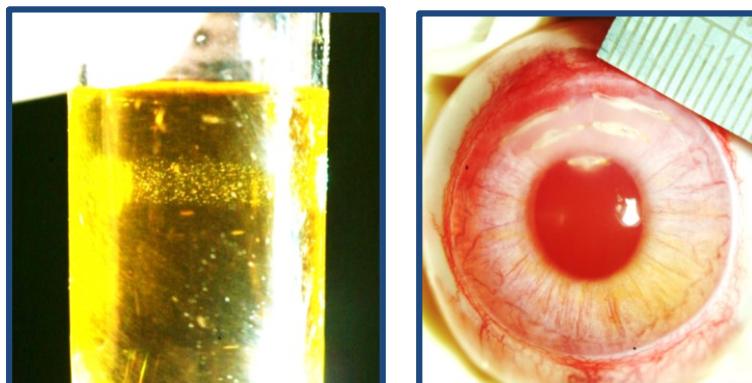


Figura 4.44. Izquierda: color amarillo dorado de sunitinib diluido en suero fisiológico (0,5 mg/ml); derecha: tinción amarillenta en el cuadrante anterior e inferior del iris de un ojo derecho de conejo que corresponde con el fármaco depositado por la gravedad.

5.

DISCUSIÓN

La neovascularización corneal (NVC) es un problema de salud importante que puede llevar a la ceguera ocular. La neovascularización o angiogénesis implica la formación de nuevos vasos a partir de vasos sanguíneos maduros. En la córnea, la NV ocurre por la proliferación a partir de los capilares y vénulas del plexo pericorneal [262], y la presencia de estos vasos aberrantes incrementa el edema y favorece la deposición lipídica, la hemorragia y la cicatrización comprometiendo la transparencia corneal y la agudeza visual [263].

Existen numerosas condiciones clínicas conocidas que implican el crecimiento de los vasos en la córnea. La NV también incrementa el riesgo de fracaso y rechazo del trasplante de córnea [19].

Para el manejo de la NVC, se han empleado numerosos tratamientos médicos y quirúrgicos. Entre los tratamientos médicos cabe destacar los esteroides, antiinflamatorios no esteroideos, ciclosporina, inmunomoduladores, agentes anti-VEGF y terapias génicas experimentales. Las opciones terapéuticas quirúrgicas incluyen el tratamiento con laser (Argón; Nd:Yag y láser amarillo), queratectomía superficial, terapia fotodinámica y diatermia con aguja. Sin embargo, ninguna de las modalidades de tratamiento produce una curación definitiva y algunos de ellos como los corticoides tienen efectos secundarios como la catarata y el glaucoma.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mediador crítico de la neovascularización corneal y está presente en altas concentraciones en la córnea neovascularizada. VEGF produce sus efectos mediante la vía de los receptores tirosina quinasa (VEGFR-1, -2 y -3) incrementando, el crecimiento, la migración y la supervivencia de las células endoteliales [125, 264], por lo que las recientes estrategias de tratamiento se han focalizado en VEGF y sus receptores.

Aunque numerosos agentes han sido probados para detener la NVC, no ha sido alcanzado ningún consenso de tratamiento.

Varias estrategias han sido utilizadas para interferir con el sistema VEGF en diferentes procesos patológicos de NV a nivel experimental y clínico. Entre otros, estos abordajes incluyen la neutralización de VEGF con anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos monoclonales, aptámeros, anticuerpos contra el receptor y proteínas de receptor soluble recombinante y receptores tirosina quinasa.

Bevacizumab es el anticuerpo monoclonal anti-VEGF más usado para el tratamiento de la NVC en estudios clínicos y experimentales. Inhibe todas las isoformas de VEGF-A [265]. Se han evaluado distintos métodos de administración (tópica, intraestromal y subconjuntival) y variados regímenes de dosis [266, 267]. También hay disponibles otros estudios comparativos de bevacizumab con otros agentes anti-VEGF como ranibizumab, el segundo antiangiogénico en frecuencia empleado para tratar la NVC. Turkcu y coautores evaluaron el ranibizumab tópico y subconjuntival en un modelo de rata experimental y demostraron que, a través de ambas vías de administración, también se reducía el área neovascular y el número de vasos neoformados [268].

Sin embargo, aunque los estudios experimentales y clínicos con anticuerpos anti-VEGF han mostrado una reducción en la longitud, densidad y/o área de NVC, este efecto es variable y no es curativo. Por ello, debido al efecto incompleto y la variabilidad en los resultados de los anticuerpos anti-VEGF, recientes estudios se han focalizado en varias etapas de la cascada VEGF y en tratamientos combinados.

La angiogénesis es un proceso de múltiples etapas que está orquestada por una variedad de factores que implica VEGF, PDGF-B y FGF. La NV involucra la proliferación y migración de las células endoteliales y los pericitos. Los pericitos que son regulados a través de la señal de PDGF-B también juegan un papel importante en la angiogénesis, maduración vascular, estabilización del vaso y también la resistencia a las terapias anti-VEGF. Estas observaciones llevaron a la

hipótesis que la combinación de la señalización de VEGF y PDGF puede ser mucho más efectiva en promover la regresión de los vasos en la neovascularización patológica ocular [250]. De hecho, el papel crítico de los factores de crecimiento distintos de VEGF ha sido respaldado en estudios previos que han demostrado que la terapia anti-VEGF sola no es tan efectiva en la regresión de los vasos maduros que se han desarrollado como resultado de una angiogénesis patológica. La actuación sobre las señales de VEGF y PDGF han mostrado una inhibición sinérgica en tumores y en modelos de neovascularización corneal en comparación con la monoterapia anti-VEGF [223, 224, 250].

Los inhibidores multiquinasa son una nueva clase de fármacos terapéuticos que actúan sobre múltiples factores han sido evaluados como agentes antiangiogénicos en oncología y en diversas enfermedades oculares [222-225, 227, 231, 233, 234, 238, 244, 269].

La presente Tesis estudia los efectos de inhibidores de los receptores tirosina quinasa vatalanib y axitinib sobre la expresión de los receptores de VEGFR y PDGF- β en un modelo de neovascularización corneal en conejo.

5.1. DIMENSIONES BÁSICAS DEL OJO DE CONEJO Y DEL ESTÍMULO ANGIOGÉNICO

El conocimiento de las características físicas de cada conejo y las dimensiones del ojo, nos permite determinar si existen diferencias entre los distintos grupos que puedan influenciar en los resultados obtenidos. Todos los conejos tenían un tamaño similar y el peso estaba comprendido entre los 2,5 y 3 kg. A partir de los diámetros corneales de la córnea, medidos con compás calibrado, y de la profundidad de la cámara anterior del ojo se estimó la superficie corneal total cuya media fue de $138,36 \pm 4,75 \text{ mm}^2$ indicando que las dimensiones de las superficies corneales totales fueron similares para todos los grupos antes del tratamiento.

El área de estímulo está representada por el área cubierta por suturas. Supuestamente si el área cubierta por suturas es de mayor tamaño, la capacidad para generar más neovasos es mayor. El ACS media fue de $27,23 \pm 2,24 \text{ mm}^2$ y tampoco se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos indicando que la cantidad de estímulo generada para inducir una respuesta neovascular fue similar.

Respecto a la capacidad de generar neovasos mediante suturas con un patrón triangular, en 2011 publicamos un trabajo en el que se evaluaba la efectividad y reproducibilidad del modelo experimental. La técnica quirúrgica fue realizada utilizando seda virgen, constituida por filamentos de seda no recubierta, resultando en una mayor respuesta angiogénica e inflamatoria que la producida por otras suturas [261]. Después de 15 días el modelo fue capaz de generar una respuesta media 112% del ACS y en todos los ojos la vascularización fue mayor del 88,3%. En nuestra opinión, el modelo presenta algunas ventajas interesantes y útiles: a) *visibilidad*: el proceso de neovascularización puede ser fácilmente identificado; b) *accesibilidad*: la respuesta angiogénica puede ser estudiada de manera no invasiva mediante observación *in vivo* usando una lámpara de hendidura; c) *procesamiento de imágenes*: la captura de la imagen, su procesamiento y su análisis pueden ser realizados fácilmente con casi todos los vasos de la superficie en foco; d) *Actividad farmacológica evaluable*: un alto número de sustancias y agentes terapéuticos pueden ser analizados por vía tópica, subconjuntival o sistémica; e) *preservación de la visión del animal*: la córnea central, no se afecta de forma grave; y por último, f) *fiabilidad y reproducibilidad*: los resultados de nuestro estudio para evaluar el modelo experimental mostraron que todos los ojos (100%) desarrollaron una vascularización extensa que cubría cerca del 90% o más del área cubierta por suturas [261].

5.2. ESTUDIO BIOMICROSCÓPICO: INHIBICIÓN DE LA SUPERFICIE DE NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL

5.2.1. Grupo control: respuesta del modelo de NVC

Tras la intervención quirúrgica, la respuesta inicial en el grupo control (Grupo A: suero fisiológico) consistió en un aumento del calibre de los vasos pericorneales probablemente secundario al aumento de la perfusión vascular producido por el estímulo angiogénico e inflamatorio de las suturas corneales. A partir del tercer día, brotaron las primeras proyecciones vasculares.

Los estudios de la superficie neovascular corneal mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura demostraron que la superficie de NV corneal se incrementó a lo largo del tiempo y 14 días fueron suficientes para que los neovasos cubrieran toda el área de estímulo (área cubierta por suturas; ACS). El modelo de neovascularización empleado, basado en la colocación de suturas formando un patrón triangular, fue efectivo para producir una respuesta neovascular intensa en todas las corneas del grupo control con una respuesta similar en todos los animales.

Si comparamos la diferencia de crecimiento entre la primera y la segunda semana, la superficie de neovascularización cubierta durante la segunda semana fue significativamente menor que la superficie neovascular alcanzada durante la primera semana. Este hallazgo paradójico se puede explicar por el hecho de que después de la primera semana casi toda el área de estímulo ya estaba cubierta por los neovasos y el área suturada que quedaba por cubrir la segunda semana era reducida y limitada.

5.2.2. Inhibición de la superficie de NVC por los IRTQs

VEGF juega un papel central en el desarrollo de la enfermedad neovascular. Esta molécula produce sus efectos mediante la vía de los receptores tirosina quinasa (VEGFR-1, -2 y -3) incrementando, el crecimiento, la migración y la

supervivencia de las células endoteliales [125, 264]. Sin embargo, algunos estudios muestran que la terapia anti-VEGF sola no es tan efectiva en la regresión de aquellos vasos maduros que se han desarrollado como resultado de una angiogénesis patológica. Las vías de señalización de otros factores, incluyendo RTQs como el PDGFR, FGFR y Tie-2 han sido implicados en la enfermedad neovascular ocular.

PDGF y sus receptores juegan un papel importante en el desarrollo embrionario y también están estrechamente relacionados con la angiogénesis. La formación de vasos sanguíneos completamente diferenciados depende de la interacción célula-célula entre las células endoteliales del brote vascular, los pericitos y/o sus células mesenquimales progenitoras. Los brotes vasculares endoteliales segregan PDGF-BB el cual a través de la unión a su receptor PDGFR- β , expresado por los pericitos, ayuda a la proliferación, diferenciación y migración de los mismos hacia el nuevo plexo endotelial formado [270]. Así pues, PDGF actúa como un factor de supervivencia de los pericitos y constituye la llave en la regulación de la unión de los pericitos al endotelio vascular. Los pericitos son componentes importantes de los complejos neovasculares en las enfermedades neovasculares estabilizando los neovasos y limitando la penetración de los agentes anti-VEGF [250].

Como hemos comentado anteriormente, PDGF-B, a través de la vía de PDGFR- β , estimula la transcripción de VEGF, por un lado, y por otro, juega un papel fundamental en el reclutamiento de los pericitos por los neovasos. Así pues, el bloqueo de esta vía inhibe el reclutamiento de los pericitos. Este hecho es de gran relevancia, puesto que sin el soporte de los pericitos y la señalización de VEGF se induce la apoptosis de la célula endotelial [76, 140, 271, 272]. Estas observaciones llevaron a la hipótesis de que la combinación de la señalización de VEGF y PDGF puede ser mucho más efectiva en promover la regresión de los vasos en la angiogénesis patológica ocular [250].

Estudios recientes han demostrado que la inhibición combinada de VEGF y PDGF potencia la regresión de los neovasos interfiriendo con la supervivencia

de la célula endotelial mediada por los pericitos y produciendo la inhibición y regresión de la NV corneal y coroidea en la DMAE comparado con el tratamiento anti-VEGF aislado [250, 271]. En un modelo de NVC, demostramos que la inhibición combinada de ambas vías PDGF y VEGF con sunitinib (IRTQ) era mucho más potente que la inhibición únicamente de la vía VEGF y se observó una reducción en la microdensidad vascular [223, 224]. Así pues, el uso de agentes farmacológicos que inhiben múltiples IRTQ puede proveer un abordaje más deseable para el tratamiento de la enfermedad ocular neovascular.

5.2.2.1 Vatalanib

Vatalanib, una anilino-ftalacina, es uno de los primeros inhibidores de la tirosina quinasa (IRTQ) sintéticos. Se trata de una molécula de tamaño pequeño con un peso molecular de 419,73 Da. Vatalanib bloquea la actividad del receptor tirosina quinasa mediante su unión competitiva al dominio de ATP en una conformación activa (IRTQ tipo I). In vitro y a concentraciones submicromolares, inhibe selectivamente los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 mediante su ligamiento al dominio ATP de la enzima tirosina quinasa. A concentraciones más elevadas, también bloquea el receptor VEGFR-3 y el PDGFR- β .

Se ha empleado como tratamiento sistémico en ensayos clínicos de diferentes enfermedades oncológicas. El tratamiento con vatalanib ha mostrado efectividad en pacientes con reincidencia o progresión de cáncer de pulmón no microcítico (Fase II) [273] y en cáncer colorrectal metastásico (Fase III) [274].

En un modelo experimental de neovascularización corneal en ratón, Hos y coautores han demostrado que la administración vía oral de vatalanib inhibe la hemangiogénesis corneal (30%) y la linfangiogénesis (70%) [233].

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existen estudios previos sobre la **aplicación tópica** de vatalanib para la inhibición de la angiogénesis corneal o cualquier otra forma de NV ocular.

Nuestros hallazgos demuestran que la administración tópica de vatalanib inhibe la NVC inducida por suturas en un modelo de conejo. La administración tópica de vatalanib a una concentración 0,4 mg/ml (GRUPO B) cada 8 horas redujo la superficie de neovascularización un 30,79% respecto al grupo control después de 14 días. La administración tópica de vatalanib 3,5 mg/ml (GRUPO C), con una concentración casi 10 veces superior al grupo B, produjo una respuesta más potente reduciendo significativamente la superficie vascular respecto al grupo control un 61,20% en el día 14 de tratamiento. Tras dos semanas de tratamiento el efecto de vatalanib fue superior en el grupo de alta concentración (Grupo C) respecto al grupo de baja concentración (Grupo B), lo que podría indicar que a una concentración de 0,4 mg/ml no se saturan todos los receptores sobre los que potencialmente puede actuar vatalanib.

La administración tópica en nuestros experimentos es mucho mayor que la IC₅₀ de los ensayos *in vitro* y a pesar de que la administración tópica es de 3 veces al día, vatalanib no inhibe completamente la vasoproliferación. La razón podría ser porque la concentración que se alcanza mediante administración tópica, no es la misma concentración que se alcanza a nivel del receptor. Por otro lado, la acción de un fármaco puede depender de muchos factores además de su potencia como es el peso molecular, la solubilidad, la penetración dentro de la célula y sus propiedades farmacocinéticas.

La diferencia de crecimiento en cada uno de los grupos entre la primera y la segunda semana no fue significativa, por lo que no se objetivó un efecto acumulativo del fármaco durante las dos semanas de tratamiento.

En conclusión, la administración tópica de vatalanib reduce significativamente el desarrollo de la NVC experimental en un modelo de conejo. No obstante, son necesarios más estudios para determinar la dosis efectiva, la eficacia del tratamiento a largo plazo, y el perfil de seguridad de vatalanib tópico antes de usar el fármaco en humanos para el tratamiento de la NVC.

5.2.2.2 Axitinib

Axitinib (AG-013736; Pfizer Inc., New York, NY, USA) es un IRTQ de pequeña molécula, derivado del indazol, que bloquea la fosforilación de múltiples receptores angiogénicos incluyendo VEGFR-1,-2 y-3, PDGFR- β y C-KIT. Ha sido clasificado como un IRTQ de clase II con capacidad selectiva que se ha investigado para numerosas formas de cáncer.

Al igual que otros IRTQ, la actividad de axitinib está relacionada con la estructura de la molécula y el espectro de inhibición de las quinasas. En comparación con otros IRTQ, a concentraciones bajas axitinib parece ser considerablemente selectivo para los receptores VEGF. Los efectos parecen resultar de la unión de axitinib al dominio quinasa de los receptores de VEGF, estabilizándolo en una conformación inactiva de la quinasa y, consecuentemente, inhibiendo la señal de transducción de VEGF [275]. Sin embargo, como previamente se ha descrito con otros IRTQs, en relación a la actividad inhibitoria de axitinib, ocurren efectos adicionales sobre otros receptores de los factores de crecimiento de la cascada de la angiogénesis.

Kernt y coautores han investigado el efecto de axitinib sobre la sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores inducidos por hipoxia en cultivos celulares para elucidar los efectos inhibitorios en la señal de VEGF. En cultivos celulares, axitinib reduce la sobreexpresión de VEGF y PDGF inducida por hipoxia. Este efecto inhibitorio de la expresión de factores de crecimiento parece ser más bien selectivo para VEGF y PDGF no presentando efectos inhibitorios significativos en la expresión de otros factores de crecimiento implicados en la neovascularización como PIGF y PEGF [243].

Los estudios preclínicos en varios modelos tumorales han mostrado que axitinib vía oral (30mg/Kg, dos veces al día) inhibe el tamaño tumoral un 70% [256]. Aunque los mecanismos de acción de los IRTQs en general y de axitinib en particular, en cuanto a la expresión de los factores de crecimiento no son del

todo conocidos, la eficacia de axitinib en tumores animales se considera que se debe a la inhibición de la angiogénesis tumoral [256, 276].

Actualmente axitinib 5 mg al día ha sido aprobado para el carcinoma de células renales avanzado [277, 278]. Además, datos recientes indican que los efectos antiangiogénicos de axitinib parecen ser ventajosos en una amplia variedad de tumores incluyendo melanomas y tumores de páncreas, tiroides, mama, pulmón y carcinomas colorectales [275, 279, 280].

A nivel ocular, Kang y coautores en un modelo murino de NVC coroidea inducida por láser han demostrado que la administración vía oral 5mg/Kg de axitinib produce la regresión de la neovascularización ya establecida y sugieren que axitinib que actúa sobre numerosos factores antiangiogénicos, incluyendo VEGFR-2 y PDGF, puede ser un potente promotor de la regresión de la NV coroidea establecida [244]. La habilidad de axitinib para causar regresión en la NV coroidea puede ser consecuencia de su actividad como IRTQ multidiana debido a que la inhibición de los receptores VEGF bloquea numerosas señales de transducción y la inhibición de PDGF bloquea el reclutamiento de pericitos, el cual es crítico para la integridad de los vasos y su función [244, 250].

Giddabasappa y coautores para evaluar la eficacia de axitinib in vitro utilizaron células endoteliales microvasculares retinianas humanas y pericitos vasculares de cerebro humano. Los resultados demostraron que axitinib inhibe las vías mediadas por VEGFR y PDGFR- β , aunque con diferente potencia. Consistente con los hallazgos de Kang y coautores, también demostraron que una baja dosis de axitinib continua (0,875 mg/día) durante 7 días inhibió el edema vascular y la neovascularización en un modelo de NV coroidea inducido por láser en ratas [245].

Hay unos pocos estudios preclínicos y clínicos que muestran que la terapia combinada de anti-VEGF y anti-PDGF-B tiene un efecto terapéutico adicional [250]. El estudio de Giddabasappa usando ensayos de proliferación in vitro demostraron que el bloqueo aislado de anti-VEGF inhibe solo la proliferación celular endotelial y el bloqueo aislado de anti-PDGF inhibe solo la proliferación de los

pericitos, mientras que axitinib puede inhibir tanto la proliferación endotelial como la inhibición de los pericitos. Adicionalmente comprobaron que axitinib tenía una sensibilidad dos veces mayor que el anticuerpo anti-VEGF. Mientras que la sensibilidad hacia el PDGFR era similar a la observada con anti-PDGF-B [245].

Hasta donde llega nuestro conocimiento es el primer trabajo que muestra la actividad antiangiogénica de axitinib tópico en un modelo de conejo.

En nuestro estudio, axitinib tópico a las diferentes concentraciones empleadas (Grupos D, E y F) produce una inhibición significativa de la NVC en comparación con el grupo control (Grupo A, suero fisiológico). Axitinib 0,02 mg/ml (Grupo D) inhibe la NVC un 39,04% después de 14 días de tratamiento respecto al grupo control; axitinib 0,35 mg/ml (Grupo E) provoca una inhibición significativa e intensa inhibiendo la NVC un 71,96% tras 14 días de tratamiento respecto al grupo control; con axitinib 0,5 mg/ml (Grupo F) la respuesta inhibitoria fue mayor inhibiendo la neovascularización un 83,74% respecto al grupo control, aunque no se evidenciaron diferencias significativas entre los dos últimos grupos en cuanto a la potencia inhibitoria. Aunque los grupos de axitinib E (0,35 mg/ml) y F (0,5 mg/ml) sí demostraron ser estadísticamente más eficaces que el grupo D (0,02mg/ml) en la inhibición de la NVC.

En la segunda semana de tratamiento se observó una desaceleración del crecimiento de los vasos en todos los grupos de axitinib que podría explicarse por la concentración acumulada del fármaco a nivel local. Sin embargo, estas diferencias de crecimiento entre la primera y la segunda semana no fueron significativas.

En nuestro estudio, aunque se consiguió una inhibición muy potente de la respuesta vascular no se logró una regresión de los vasos formados los primeros días. La no regresión pudo ocurrir porque el estímulo angiogénico producido por este modelo de suturas es muy potente, y por otro lado, hay que considerar que existe la posibilidad que lo que algunos autores describen como una regresión de los neovasos corneales se trate simplemente del proceso natural de eliminación de neovasos redundantes una vez que se ha reparado el daño corneal. Burger y

coautores en sus estudios biomicroscópicos y angiográficos sobre un modelo de neovascularización corneal experimental ya describieron estos hallazgos [281]. Para el funcionamiento de un sistema vascular a partir de la red vascular preexistente es necesaria la adición de nuevos segmentos (angiogénesis), la alteración de los segmentos existentes (remodelación) y la eliminación de los segmentos redundantes. El ajuste continuo de los vasos y las estructuras de la red vascular se produce en respuesta a las necesidades funcionales. Dar una explicación clara de por qué desaparecen estos vasos es difícil puesto que la angiadaptación es un proceso complejo donde interactúan la respuesta vascular, el estado metabólico del tejido y las fuerzas hemodinámicas ejercidas por el flujo sanguíneo evocando un proceso de remodelado dinámico e implicando un alto grado de plasticidad vascular [282].

Los receptores VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 son considerados dianas de axitinib. VEGFR-2 juega un papel mayor en la señal estimulada por VEGF mediando, de este modo, la supervivencia, migración y proliferación de las células endoteliales, así como la permeabilidad vascular [283]. Axitinib tiene una alta potencia contra VEGFR-2 el cual es conocido como el principal mediador de la angiogénesis inducida por VEGF. Axitinib inhibe *in vitro* la autofosforilación de VEGFR-2 con una IC₅₀ de aproximadamente 0,2 nmol/l y de VEGFR-1 con una mayor IC₅₀ (1,2 nmol/l) [256]. Por tanto, es razonable hipotetizar que la inhibición de VEGFR-2 puede ser una estrategia para el tratamiento de la CNV basado en el hecho de que disminuye fuertemente la señal de transducción por la inhibición de la función del receptor.

Aunque VEGFR-1 se ha hipotetizado que juega un papel negativo en la proliferación endotelial en los estados tempranos del desarrollo, donde el dominio extracelular del receptor tiene una excelente habilidad para ligar VEGF-A, absorbe VEGF-A para guardarlo a una concentración local apropiada [284]. En ciertas patologías angiogénicas, sin embargo, los resultados indican que VEGFR-1 también contribuye a la angiogénesis [285]. Así pues, el papel de VEGFR-1 en la

angiogénesis ocular debe ser clarificado. Existe la hipótesis de que el factor pla-centario contribuye al crecimiento vascular afectando a las células derivadas de la médula ósea [286].

En condiciones asociadas con la angiogénesis patológica como la NVC, es esperable que axitinib interfiera con la señalización que surge de la activación de estos otros RTQ y actuar, de este modo, como un antagonista efectivo de la señalización. Así pues, además del receptor VEGFR-1 y VEGFR-2, axitinib bloquea el receptor VEGFR-3.

Debido a este bloqueo simultáneo de la actividad quinasa de VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, se espera que que la respuesta tenga un perfil distinto que la neutralización de un solo subtipo de receptor. El bloqueo selectivo de VEGF-A, como con los anticuerpos monoclonales, neutraliza la señal iniciada por el factor de crecimiento. Sin embargo, existe un rango de subtipos de VEGF, los cuales todos juegan un papel en la señalización de los tres receptores de VEGF conocidos. Por ejemplo, aunque VEGF-A ha mostrado ser un conductor de la señal de VEGFR-2, está claro que no es el único ligando para VEGFR-2 [115, 287]. Además, VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 tienen sitios catalíticos de unión a ATP altamente conservados [288], y como axitinib se dirige a este sitio, se une a los tres subtipos de receptor. Debido al papel central de la actividad quinasa de los VEGFR, si una pequeña molécula bloquea VEGFR-1,-2 y -3 podría entonces proporcionar un abordaje completo para el bloqueo de la señal de VEGF.

Por otro lado, un incremento de los niveles de VEGF ha mostrado inducir un descenso en la ocludina, expresado en los complejos de unión de las CEV, produciendo un incremento de la permeabilidad [289]. Kernt y coautores, demostraron el efecto estabilizante de axitinib en cultivos celulares de epitelio pigmentario retiniano y en la permeabilidad vascular endotelial mediante la atenuación del descenso de los complejos de proteína ocludina y la ZO-1, después de condiciones hipóxicas, proporciona la evidencia clínica de que axitinib ofrece propie-

dades prometedoras para el tratamiento de las complicaciones oculares en pacientes diabéticos. También, en este experimento, axitinib permitió una reducción de la expresión de PDGFR- β [243].

Axitinib potencialmente a concentraciones submicromolares bloquea más de un factor que es casualmente responsable del desarrollo de la enfermedad vascular entre los que se encuentra PDGF.

Así pues, la habilidad de inhibir múltiples vías angiogénicas puede ser necesaria para causar la regresión de los vasos, la cuál puede no ser alcanzada únicamente mediante la terapia anti-VEGF [271, 272].

No está claro si otras actividades inhibitorias de vatalanib y axitinib contribuyen a su alto nivel de eficacia, pero existe cierta evidencia de que el bloqueo de PDGF y VEGF-A puede ser superior que ambos juntos. Las células endoteliales producen PDGF-B el cual promueve el reclutamiento, proliferación y supervivencia de los pericitos.

También existe evidencia de que el factor de las células madres y su receptor C-KIT contribuyen a la angiogénesis incrementando la localización nuclear de HIF-1 α resultando en la elevación de VEGF, PDGF y angiopoyetina-2 y produciendo otros genes que contienen un elemento de respuesta a la hipoxia dentro de su promotor. Es conocido que el bloqueo de C-KIT proporciona un beneficio añadido en el tratamiento de la NV ocular asociado al bloqueo de VEGF y PDGF, pero es una suposición razonable, porque la Ang-2 es un importante estimulador de la angiogénesis [290].

5.2.2.3 Diferencia entre los distintos fármacos antiangiogénicos

En 2010, publicamos los resultados de un estudio experimental en la córnea de conejo, en el que se comparó sunitinib (IRTQs multidiana anti-VEGF y anti-PDGF) con bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGF). Demostramos que la administración de sunitinib era 3 veces más efectiva que bevacizumab en

la inhibición de la NV corneal, la NVC fue inhibida en 82,3% con sunitinib tópico después de 14 días [223].

Bevacizumab se une a VEGF y lo desactiva resultando en la inhibición de la formación de vasos sanguíneos anormales. Sin embargo, al igual que en otros muchos estudios realizados previamente, observamos que bevacizumab no inhibe completamente la neovascularización mediante la vía subconjuntival o tópica [189, 223, 291, 292]. El bloqueo VEGF mediante anticuerpos monoclonales ha sido validado como una terapia efectiva para enfermedades asociadas con angiogénesis patológica y los resultados demuestran que en estados tempranos de la angiogénesis el bloqueo de la señal de VEGF puede prevenir el crecimiento de los nuevos vasos efectivamente. Sin embargo, numerosos estudios también han mostrado que la terapia anti-VEGF puede no ser suficiente para causar la regresión de los vasos más maduros en estados avanzados.

Los hallazgos de nuestro trabajo publicado en 2010, sugirieron que el bloqueo simultáneo de los sistemas VEGF y PDGF mediante el sunitinib es más eficaz en la inhibición de la NVC que el bloqueo aislado del sistema VEGF mediante bevacizumab. Por tanto, la inhibición combinada de las vías de señalización de ambos factores VEGF y PDGF podría ser más eficaz que la inhibición única del sistema VEGF para el tratamiento de la NVC [223]. A este respecto, los agentes que inhiben múltiples vías angiogénicas serían más deseables para un mejor abordaje terapéutico.

Si comparamos las concentraciones más altas empleadas de axitinib y vatalanib, observamos que axitinib produce una inhibición de la neovascularización más intensa que vatalanib (83,74% y 61,20%, respectivamente) después de 14 días de tratamiento. Así pues, axitinib resultó ser 1,36 veces más potente que vatalanib en la inhibición de la NVC.

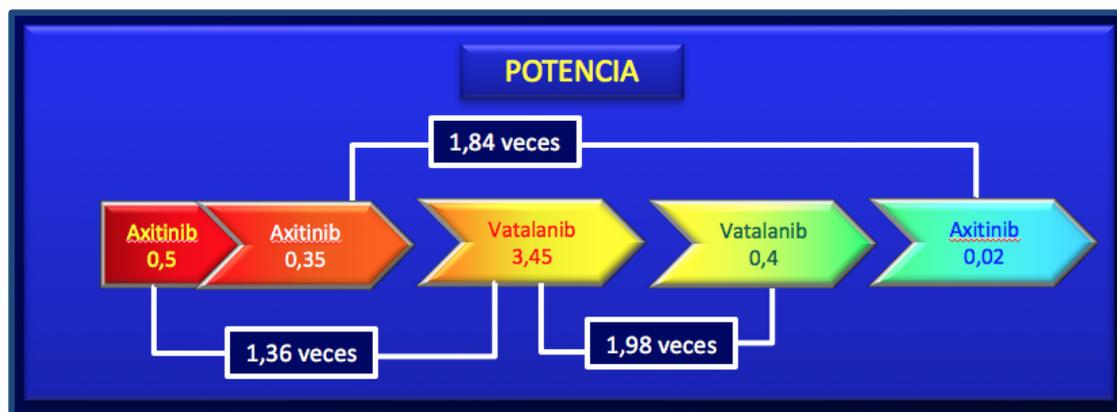


Figura 5.1. Diferencias de la potencia de los inhibidores de los receptores tirosina quinasa estudiados con relación al porcentaje de inhibición de la superficie de NVC respecto al grupo control medida en mm².

Si comparamos los resultados de la presente Tesis con los resultados que obtuvimos en experimentos previos realizados con sunitinib utilizando la misma metodología, axitinib 0,35 mg/ml y axitinib 0,5 mg/ml no presentan diferencias estadísticamente significativas con sunitinib 0,5 mg/ml (datos no mostrados). Con los datos del mismo trabajo, también podemos postular que el tratamiento con las concentraciones más altas de vatalanib y axitinib son más efectivas en reducir la superficie de NVC que bevacizumab [223, 224].

La señalización de PDGF-B, a través de su receptor PDGFR- β , regula el reclutamiento de las células murales hacia el tubo endotelial vascular en crecimiento. Las células murales (pericitos y células musculares lisas) son necesarias para una normal estabilidad y función del vaso. Las células murales proporcionan esta estabilidad cuando los niveles de VEGF-A están comprometidos, de modo que los pericitos reducen la dependencia de VEGF-A por parte del vaso para asegurar su supervivencia. Así pues, la terapia anti-VEGF se puede ver limitada por el hecho de que los nuevos vasos cambian su dependencia de VEGF a lo largo del tiempo y según la maduración del vaso [234].

La inhibición de la señal de PDGF previene del reclutamiento de las células murales hacia los vasos nacientes e induce el desprendimiento de los pericitos en los vasos maduros. Jo y coautores demostraron que la inhibición de VEGF-A y PDGF-B es más efectiva que el bloqueo aislado de VEGF-A causando la regresión de los vasos en múltiples modelos de crecimiento neovascular. Además, la pérdida de pericitos, producida por la inhibición de la señalización de PDGF-B, hace que los vasos en crecimiento sean más sensibles al bloqueo anti VEGF-A [250].

Cursiefen y coautores en un estudio clínico patológico en botones corneales observaron que dos semanas después de aparecer la NVC, más del 80% de los vasos están cubiertos por los pericitos [49]. Por ello, el tratamiento combinado contra las células endoteliales y pericitos es necesario para potenciar el tratamiento contra los neovasos en un estado avanzado de maduración. Los pericitos, reclutados por los vasos a través de la acción de PDGF, están ligados a la formación del vaso y su estabilización durante la NVC patológica. En este estado, las células endoteliales se hacen menos dependientes de VEGF. Además del proceso paracrino, el contacto célula-célula potencia la supervivencia de la célula endotelial vascular [293, 294]. Así pues, en un estado avanzado de maduración, los vasos son restrictivos hacia una terapia anti-VEGF.

La inhibición de la señal de PDGF resulta en una pérdida de pericitos y una disminución de la densidad vascular en un estado avanzado de neovascularización en un modelo de ratón. Además, la atenuación del pericito causada por el bloqueo de PDGF puede potenciar el efecto antiangiogénico del inhibidor del receptor de VEGF [234]. Por ello, es necesario una mayor atención sobre los pericitos y sus interacciones con las células endoteliales para comprender el completo potencial de la terapia antiangiogénica.

Los IRTQs son conocidos por actuar en un amplio rango de quinasas, haciendo difícil descartar que los efectos deseados sean también producidos por el bloqueo de otras quinasas distintas de PDGF- β . Sin embargo, la potencial acción de vatalanib y axitinib sobre los receptores VEGF y PDGF sugiere que esta acción

combinada tiene un valor terapéutico añadido induciendo una mayor inhibición de los vasos.

Todo esto nos permite concluir que vatalanib y axitinib, a las dosis y duración utilizadas en el estudio es segura y bien tolerada y puede tener un papel como un abordaje adjunto a la terapia convencional de la NVC: Ensayos clínicos prospectivos y aleatorizados son necesarios para determinar la dosis ideal y la duración del tratamiento.

5.3 ESTUDIO HISTOLÓGICO: DISMINUCIÓN DE LA MICRODENSIDAD VASCULAR POR LOS IRTQs

La evaluación de la extensión de la NVC en la lámpara de hendidura como marcador único de la respuesta neovascular corneal puede ser insuficiente. Por ello, el estudio de la angiogénesis se complementó con un análisis de imagen para facilitar la identificación de los vasos, estudios histológicos para evaluar el grado de microdensidad vascular y la morfología de los vasos sanguíneos.

En relación a la microdensidad vascular, al comparar el área de sección de los vasos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de los vasos de los distintos grupos. En cuanto a la densidad vascular, se observó una reducción del número de vasos en los grupos tratados con IRTQ respecto al grupo control, pero no se observaron diferencias entre las distintas concentraciones de los dos fármacos empleados. El porcentaje de área vascularizada respecto al estroma de las secciones corneales depende del número y del calibre de los vasos, por lo que también se observó una disminución del área vascular en los distintos grupos farmacológicos respecto al grupo control, aunque tampoco se hallaron diferencias significativas entre las concentraciones de axitinib y vatalanib utilizadas.

Si comparamos para cada fármaco las diferencias de densidad vascular entre la zona proximal al limbo (Zona 1) y la zona distal al limbo (Zona 2), expresadas en número de vasos/mm² y porcentaje de área vascularizada, no se observaron diferencias significativas en el grupo control (grupo A) y en los grupos de las concentraciones bajas de vatalanib (grupo B) y axitinib (Grupo D). Sin embargo, en los grupos farmacológicos con concentraciones altas (vatalanib 3,5 mg/ml-Grupo C; axitinib 0,35 mg/ml-Grupo E y axitinib 0,5 mg/ml-Grupo F) se observó una reducción de la densidad estadísticamente significativa de la zona distal respecto a la zona proximal. La capacidad inhibitoria del axitinib de alta concentración (0,5mg/ml) se demuestra en la Zona 2 y se caracterizó por una ausencia total de neovasos en todas las corneas evaluadas.

Estos hallazgos sugieren que los IRTQ, además de reducir el área de superficie neovascular producen una reducción eficaz del número de neovasos.

Aunque no se hayan detectado diferencias significativas en el calibre de los neovasos respecto al grupo control, en el estudio cualitativo de la morfología de los vasos hemos podido observar diferencias interesantes entre el grupo control y los grupos farmacológicos.

La morfología de las superficies vascularizadas del grupo control (Grupo A) mostraron un plexo vascular inmaduro, no jerarquizado, constituido por un laberinto de canales anastomosantes cortos y ramificados. En las áreas más distales se identificaron las yemas vasculares.

Sin embargo, en los grupos tratados con IRTQs (Grupos B-F) se evidenciaron características estructurales diferentes en la morfología del árbol vascular. En estos grupos, la respuesta vascular quedó limitada a unas pequeñas formaciones con varios ejes vasculares con una disposición arborescente en comparación con el grupo control que presentó una distribución vascular más direccional hacia el vértice del estímulo, extensa y frondosa. Los ejes vasculares estaban constituidos por una arteria central de pequeño calibre con ramificaciones cortas sin una orientación tan definida como la de los otros grupos. Estos hallazgos sugieren que los procesos moleculares y biológicos asociados al sistema VEGF y/o

PDGF pueden tener un papel importante en el remodelamiento de los vasos neoformados.

5.4. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO: ANGIOGÉNESIS, INFLAMACIÓN Y CAMBIOS ESTRUCTURALES

Cursiefen y coautores analizaron los botones corneales del receptor después de una queratoplastia y encontraron que el 20% presentaba angiogénesis. La localización más común de los nuevos vasos fue en el tercio superior y medio del estroma corneal. Este estudio demostró que la angiogénesis es un hallazgo histopatológico común en las enfermedades corneales que llevan al trasplante de córnea [248].

En nuestro estudio, observamos también que los vasos se localizan principalmente en los dos tercios superiores de la córnea, a pesar de que los puntos generalmente se localizan en el tercio inferior. Puesto que la migración de los vasos se produce siguiendo principalmente el gradiente de concentración de VEGF [54], sugerimos que la concentración de citoquinas angiogénicas debe ser mayor en las capas estromales más superficiales de la córnea.

Cursiefen y coautores también observaron que la vascularización corneal estaba asociada a edema corneal, células inflamatorias o ambas [248]. En estos casos la inflamación es peligrosa para el huésped ya que se produce una destrucción y un daño excesivo de los tejidos que conducen a la pérdida de función del órgano.

La respuesta inflamatoria, se inicia como consecuencia de una lesión o estimulación directa de los componentes estructurales de un tejido que son: a) las células parenquimatosas; b) la microvascularización, c) los macrófagos y mastocitos del tejido, d) las células mesenquimatosas y e) la matriz extracelular. Una de las primeras respuestas que se produce tras la lesión del tejido tiene lugar en la microvascularización y las vénulas postcapilares, donde se encuentran los

componentes más importantes de la respuesta inflamatoria, es decir, el plasma, las plaquetas, los eritrocitos, y los leucocitos circulantes. En condiciones normales el revestimiento continuo de las células endoteliales, conectados entre sí entre uniones íntimas y separadas del tejido por la membrana basal limitante tiene a los componentes confinados en el interior del compartimento intravascular. Sin embargo, cuando el tejido sufre una agresión los componentes estructurales de la pared dan lugar a la activación de las células endoteliales; la pérdida de la integridad vascular, la salida de líquido y de los componentes del plasma desde el compartimento vascular y la migración de los eritrocitos desde el espacio vascular hacia el tejido extravascular [295].

La respuesta de los vasos a la lesión está regulada por mediadores específicos de la inflamación en foco inflamatorio, entre estos mediadores se encuentran las moléculas vasoactivas que actúan directamente sobre la pared vascular aumentando su permeabilidad. Se generan también factores quimiotácticos que atraen leucocitos desde el compartimento vascular hacia el tejido alterado. Se conoce bien que los macrófagos pueden jugar un papel en la patogénesis de la NV ocular. MPC-1 es una de las moléculas más potentes reclutadoras de macrófagos y se considera que está asociada con la patogénesis de la NV ocular.

Además, en un estudio con sorafenib, en un modelo de NV corioidea en ratas, se demostró que este IRTQ reduce la expresión de los genes ICAM-1, la cual está implicada en la adhesión endotelial leucocitaria y la migración de los leucocitos, lo que podría tener un efecto antiangiogénico y antiinflamatorio [226].

En el grupo control (Grupo A), el estudio anatomopatológico de hematoxilina-eosina mostró una intensa reacción inflamatoria a cuerpo extraño constituida por la presencia de un infiltrado linfoplasmocitario denso y células gigantes multinucleadas.

Las secciones histológicas corneales de los IRTQs, a diferencia del grupo control, mostraron unos granulomas bien delimitados alrededor de los puntos de

sutura proximales con una distribución homogénea y localizada del infiltrado linfoplasmocitario, las células epiteloides y los macrófagos. El edema corneal también fue menor que en el grupo control.

En los puntos distales de los grupos de axitinib de alta concentración (Grupo E y F) apenas se observó reacción inflamatoria. Estas características de la respuesta inmune podrían ser explicadas por la potente inhibición de los vasos sanguíneos y linfáticos, permitiendo el acceso de las células inflamatorias a los puntos de sutura sólo mediante la difusión a través del estroma desde los vasos límbicos preexistentes y los neovasos marginales. De hecho, los IRTQs, a través del bloqueo de los receptores de VEGF, reducen el reclutamiento de las células precursoras linfáticas y de las células presentadoras de antígeno (*Antigen presenting-cell; APC*) y suprimen la proliferación de las células endoteliales vasculares [233].

5.5. EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS IRTQs

Los efectos adversos de toda sustancia dependen de la frecuencia de las dosis, el tiempo de exposición y la concentración.

Los ensayos clínicos con **vatalanib** sistémico en caso de cáncer avanzado revelaron efectos adversos del fármaco como náuseas, vómitos, fatiga, mareo, ataxia y aumento de la presión arterial en un 25-75% de los participantes. El riesgo de crisis hipertensiva fue especialmente alto en aquellos pacientes que sufrieron hipertensión arterial [232]. Por ello, es preferible una administración local por el bajo riesgo de potenciales efectos sistémicos. La hipertensión parece ser un efecto que ocurre en todas las terapias que actúan sobre VEGF, pero generalmente puede ser manejada con el tratamiento oral estándar.

El perfil de efectos adversos de **axitinib** que ocurre con la administración sistémica continua también parece ser comparable con el perfil de efectos adversos que ocurre con las medicaciones anti-VEGF sistémicas. El más común de los

efectos adversos producido por el axitinib sistémico es la fatiga causada por el hipotiroidismo [280]. Otros efectos relacionados son la hipertensión, la anorexia, ronquera y náuseas [277]. Sin embargo, los efectos adversos son generalmente bien manejados con la modificación de la dosis y tratamiento de soporte [277, 279, 280].

Durante el estudio se determinó la seguridad de vatalanib y axitinib tópico en el tratamiento de la NVC definido por la evaluación de efectos oculares y sistémicos adversos.

En nuestro modelo experimental, después de 14 días de tratamiento, los ojos tratados con vatalanib (0,4 mg/ml y 3,5mg/ml) no mostraron alteraciones en la conjuntiva, epitelio corneal, iris o cristalino. Vatalanib, en comparación con el suero fisiológico no produjo alteraciones en la superficie ocular, a pesar del pH ácido (3,75 - 4,5) de las dos concentraciones empleadas.

Axitinib tópico a las diferentes concentraciones empleadas (0,02 mg/ml, 0,35 mg/ml y 0,5 mg/ml), después de 14 días de tratamiento, también fue bien tolerado y no se objetivaron efectos adversos en las distintas estructuras oculares.

En estudios experimentales previos, en los que se empleó el IRTQ sunitinib se observó una tinción amarillenta en todos los ojos, que desapareció a los pocos días de suspender el tratamiento, provocada por el depósito de sunitinib sobre la superficie del iris puesto que el agente en suspensión tiene un color amarillo-dorado. El depósito de sunitinib sobre la superficie del iris fue un hallazgo de gran relevancia porque actuó como un trazador indicando que la molécula es capaz de alcanzar la cámara anterior después de la aplicación tópica, hecho que podría ser de gran utilidad clínica para el tratamiento de enfermedades neovasculares intraoculares [223, 225]. Sin embargo, es cierto que en la práctica clínica podría considerarse un efecto secundario no deseado en tratamientos prolongados o crónicos. En nuestro estudio, no observamos estos hallazgos con ninguno de los IRTQs empleados debido a que vatalanib y axitinib son de color blanco y tras la dilución con suero fisiológico se muestran incoloros.

En contraste con las terapias biológicas como rabibizumab y bevacizumab, compuestos que son derivados de los anticuerpos murinos y son producidos en cultivos tisulares de mamíferos o en bacterias, los IRTQ son moléculas sintéticas y su riesgo de aumento de inmunogeneidad es bajo, por lo que disminuye las posibilidades de resistencia al tratamiento.

Sin embargo, una disrupción excesiva de los agentes angiogénicos podría producir la inhibición de funciones biológicas que todavía se desconocen. En el tratamiento de las terapias dirigidas contra el sistema VEGF debemos tener en cuenta las siguientes consideraciones:

En la córnea VEGF parece tener un efecto neurotrófico, por tanto, se debe tener especial cuidado cuando se utilizan anti-VEGFs en pacientes con queratopatía neurotrófica. Asimismo, VEGF participa de la curación de las heridas epiteliales y estromales corneales, efecto en parte debido a su papel en el reclutamiento de macrófagos [296]. De hecho, la depleción de VEGF puede retrasar la curación de la herida epitelial y estromal de la córnea [297]. Así pues, también es necesario tener precaución al aplicar los tratamientos anti-VEGFs en presencia de defectos epiteliales o en situaciones donde tenga lugar la curación de una herida corneal. Además, la inhibición del reclutamiento de macrófagos podría afectar la respuesta inmune corneal contra agentes infecciosos.

Por otro lado, en ratones con una deficiencia de PDGF-B, se ha descrito la presencia de una retinopatía vascular focal acompañada de una pérdida de células murales retinianas (pericitos) desencadenando una entidad similar a la retinopatía diabética [139, 140]. Recientemente, se ha descrito un caso de una paciente con cáncer renal metastásico tratada con axitinib sistémico a una dosis de 8 mg/día que desarrolló una microangiopatía isquémica con microhemorragias y depósitos algodonosos que revirtió al cesar la medicación [298]. Por ello, son necesarios estudios adicionales para definir los posibles efectos secundarios y la toxicidad de estas sustancias cuando se usan en el ojo durante un extenso periodo de tiempo.

En resumen, son necesarios estudios para determinar las dosis óptimas, los efectos secundarios y los mecanismos de acción, y de este modo, poder investigar la aplicabilidad de vatalanib y axitinib como una alternativa terapéutica para el tratamiento de las patologías neovasculares del ojo.

5.6. VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE LOS IRTQs

El método más deseado de liberación de los fármacos es teóricamente la vía de tratamiento tópica porque esta ruta puede evitar los potenciales efectos secundarios oculares de las inyecciones y los efectos secundarios sistémicos de la administración oral.

La **administración tópica** se podría considerar como la vía de administración ideal para el tratamiento de la NVC, puesto que, tal como hemos observado en las secciones histológicas estudiadas, los neovasos corneales se localizan generalmente en los dos tercios anteriores del estroma corneal constituyendo una ubicación relativamente accesible para el fármaco.

Mediante la administración tópica sería posible monitorizar las distintas dosis y posologías terapéuticas en base a cada patología y en función de su gravedad; y facilitaría el uso de los fármacos como tratamiento preventivo ante los primeros indicios de una neovascularización de la córnea. Además, con la finalidad de crear un colirio de axitinib con una dispersión estable, recientemente, ha sido solubilizado en micelas usando nanopartículas copoliméricas MPEG-PCL (Metoxi poli(etilenglicol)-poli(caprolactona)) con capacidad anfifílica consiguiendo una buena homodispersión y mejorando su biodisponibilidad [299].

Nuestros datos demuestran que vatalanib y axitinib mediante administración tópica reducen significativamente la angiogénesis corneal a través del bloqueo de la señal de VEGF y PDGF durante el desarrollo de los nuevos vasos y, en este sentido, sugerimos que ambos fármacos pueden ser buenos candidatos para el tratamiento de la NVC en la práctica clínica.

La **administración intravítrea** con anticuerpos monoclonales se ha usado ampliamente en la práctica clínica para el tratamiento de las patologías neovasculares del polo posterior del ojo. También muchos investigadores, en estudios experimentales, han empleado IRTQs mediante vía oral o intravítrea para inhibir las vías de señalización relacionadas con los receptores tirosina quinasa como potencial tratamiento de la NV coroidea.

Sin embargo, las inyecciones intravítreas resultan desagradables para los pacientes y, a veces, son necesarios repetidos tratamientos. Las inyecciones intraoculares frecuentes se asocian generalmente a riesgo de endoftalmitis, desprendimiento de retina, y hemorragia vítrea. Por tanto, es necesario evaluar nuevas vías de abordaje o dispositivos de liberación para reducir las potenciales complicaciones del tratamiento intravítreo e identificar modalidades terapéuticas alternativas.

La **administración subconjuntival** puede ser una posibilidad para la liberación del fármaco, especialmente con fármacos como los inhibidores tirosina quinasa que tienen una buena penetración y se debería investigar en futuros experimentos. Para mejorar este efecto, algunos dispositivos de liberación retardada administrados subconjuntivalmente podrían ofrecer la posibilidad de un tratamiento local de larga duración. La liberación transescleral permite transferir fármacos al polo posterior porque la esclera tiene una mayor superficie que la córnea, un mayor grado de hidratación y un bajo número de células y es permeable incluso a compuestos de gran peso molecular [300, 301]. Se ha sugerido que la vía subconjuntival podría actuar como un depósito de liberación gradual permitiendo una mayor absorción de los tejidos. Sin embargo, en un estudio experimental de conejo, Ko y coautores compararon la administración tópica y subconjuntival del IRTQ sunitinib, consiguiendo unos mejores resultados mediante la vía tópica [225]. Además, la administración tópica permite un uso más sencillo en la práctica clínica oftalmológica. No obstante, serán necesarios futuros estudios para optimizar las dosis y posibles combinaciones con otros inhibidores de la angiogénesis.

El desarrollo de los IRTQs tópicos para que puedan alcanzar el polo posterior puede ser atractivo para el tratamiento de las enfermedades neovasculares intraoculares como la DMAE, retinopatía diabética, glaucoma neovascular etc.

Generalmente, se ha considerado que tras una administración tópica no es posible alcanzar niveles adecuados de un fármaco en la retina para el tratamiento de patologías retinianas. No obstante, estudios recientes han sugerido que no siempre ocurre así. Por ejemplo, Nepafenaco es un profármaco del anfenaco (agente antiinflamatorio no esteroideo) que reduce la síntesis de prostaglandinas en la coroides un 50% a las 4 horas después de una única gota aplicada tópicamente en conejos [302].

A diferencia de los anticuerpos monoclonales, los IRTQs son moléculas de pequeño tamaño que, penetran fácilmente a nivel intraocular mediante administración tópica, tal como demostramos en un estudio previo con sunitinib [223], convirtiendo a los IRTQs en fármacos potenciales para el tratamiento tópico de las patologías neovasculares oculares que afectan al polo posterior. Esta ruta no invasiva, en comparación con la inyección intravítrea y la administración oral, se asocia con menor riesgo de efectos adversos sistémicos.

De hecho, se ha demostrado que un IRTQ, pazopanib, es capaz de reducir la NV coroidea a nivel experimental mediante administración tópica o sistémica [235, 239, 290]. Sin embargo, clínicamente pazopanib tópico se administró en pacientes con membranas neovasculares subfoveales secundarias a degeneración macular y no se consiguieron unos resultados satisfactorios, aunque se observó una mejora de la agudeza visual corregida. La mejora se produjo solamente en un subtipo de pacientes con el genotipo CFH Y402H TT. Para explicar este perplejo resultado Danis y coautores propusieron que el fármaco podría haber causado un efecto favorable en la función neuronal/receptor sin influenciar en el proceso exudativo [239].

Por otro lado, se ha mostrado que la coadministración de axitinib sistémico con anticuerpos anti-VEGF incrementa el efecto del anticuerpo anti-VEGF [256].

Así pues, en combinación, una dosis menor de la **administración sistémica** podría reducir los conocidos efectos secundarios.

Las complicaciones asociadas con la inyección intravítrea deben ser evitadas y los IRTQs estudiados en la presente Tesis, especialmente axitinib, podrían ser usados como una alternativa terapéutica tópica o sistémica. Un régimen de dosis eficiente y seguro podría convertir a axitinib en una promesa para el tratamiento de las NV coroideas refractarias, así como una reducción en la frecuencia de las inyecciones intravítreas. No obstante, futuros estudios evaluando la seguridad de una dosis crónica y una plataforma de liberación sostenida deben ser investigados para justificar su uso terapéutico.

5.7. EL PRINCIPAL OBJETIVO TERAPÉUTICO: LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO DEL TRANSPLANTE DE CÓRNEA

El grado de rechazo del injerto corneal después de un transplante depende en gran medida de su situación preoperatoria. Además, el abordaje quirúrgico empleado tiene impacto en el rechazo siendo significativamente menor en injertos lamelares como DMEK [303] y DALK [304] que en la queratoplastia penetrante.

La neovascularización tiene un impacto notable en la supervivencia del injerto corneal, antes y después de la queratoplastia. El riesgo de fracaso aumenta conforme el grado de neovascularización es mayor, especialmente en presencia de inflamación y/o presión intraocular elevada [305]. Cuando el botón corneal se inserta en un lecho avascular (queratoplastia de bajo riesgo), la supervivencia del injerto alcanza el 90% a los 2 años solo con tratamiento corticoideo tópico, incluso sin el pareo del HLA [306, 307]. Por el contrario, la supervivencia del injerto corneal colocado en un lecho vascularizado sin privilegio inmune (queratoplastia de alto riesgo) decrece significativamente por debajo del 50% [18, 19, 41]. Además, incluso en condiciones de bajo riesgo, una leve hemangiogénesis corneal y linfangiogénesis desarrolladas después de la queratoplastia incrementa el riesgo para un rechazo inmunológico [308, 309].

El factor de crecimiento endotelial vascular es un mediador crítico en la NVC. VEGF incrementa el crecimiento, la migración y la supervivencia de las células endoteliales vasculares [125]. De hecho, el bloqueo de VEGF-A después del trasplante resulta en un incremento significativo de la supervivencia del injerto [310, 311]. Por ello, existe un creciente interés en prevenir la NV después de la queratoplastia usando agentes antiangiogénicos. El factor derivado de las plaquetas (PDGF) es también un importante mediador de la neovascularización jugando un papel importante en el reclutamiento de los pericitos, un tipo de células murales que estabiliza y madura los vasos neoformados [140]. De este modo, **vatalanib y axitinib**, a través del bloqueo de VEGFR-2 y de PDGF podrían mejorar la supervivencia del injerto.

En un modelo murino, Dietrich y coautores observaron que los vasos linfáticos parecen jugar un papel superior en la mediación del rechazo del injerto comparado con los vasos sanguíneos [312]. Los vasos corneales linfáticos permiten el acceso del tejido donante a las células presentadoras de antígenos del huésped y del material antigénico a los ganglios linfáticos regionales, donde se acelera la sensibilización a los antígenos del injerto (brazo aferente de la respuesta inmune) [313, 314].

La linfangiogénesis procede de los vasos linfáticos limbares pre-existentes o de vasos sanguíneos, en particular las venas. En el estroma corneal, aparecen repentinamente estructuras con endotelio linfático similares a vasos linfáticos. Estas estructuras primitivas se pueden fusionar o formar conexiones con los canales linfáticos pre-existentes. Se ha sugerido que las células mesodérmicas pueden dar lugar a células endoteliales linfáticas y macrófagos que contribuyen directamente a esta formación de los vasos linfáticos [315]. Tras el trasplante, los macrófagos reclutados en el foco inflamatorio producen factores que podrían jugar un papel destacado en los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis [316, 317]. Así pues, en un futuro la supresión de la función de los macrófagos podría convertirse en una nueva estrategia terapéutica para la prevención del rechazo de la queratoplastia.

Durante la inflamación, los macrófagos secretan VEGF-A, -C y -D y expresan VEGFR-3 resultando en la inducción de hem- y linfangiogénesis [317]. VEGF-C y VEGF-D, actuando sobre VEGFR-3, hacen importantes contribuciones en el crecimiento y el desarrollo de los vasos linfáticos [318]. De hecho, se ha demostrado que la inhibición específica de su receptor solamente (anticuerpos contra VEGFR-3) es suficiente para bloquear la linfangiogénesis corneal [319].

Por otro lado, los IRTQs parecen tener la habilidad para restringir la formación de un brazo aferente y eferente del arco del reflejo inmune promoviendo la supervivencia del injerto corneal después del trasplante [233]. *In vitro*, el receptor VEGFR-3 es inhibido por **vatalanib** a concentraciones milimolares (IC₅₀ 0,6 mM) [253] y por **axitinib** a concentraciones subnanomolares (IC₅₀ 0,3 nM) [207, 256]. En un modelo de ratón, Hos y coautores evaluaron el efecto de vatalanib administrado por vía sistémica sobre la NVC. En este estudio la hemangiogénesis corneal fue inhibida un 30% y la linfangiogénesis un 70% y demostraron también que inhibe el reclutamiento de los macrófagos en la córnea [233]. Hasta donde podemos conocer, no existen estudios que valoren la respuesta linfangiogénica en un modelo corneal mediante la administración de axitinib.

Los IRTQs (axitinib y vatalanib) usados tópicamente podrían formar parte de tres estrategias de prevención de los neovasos [55]:

Terapia antilinfangiogénica previa a la queratoplastia:

- a) Prevención primaria: Si el crecimiento de vasos en la córnea durante la patología corneal puede ser prevenido, la queratoplastia de alto riesgo sobre un lecho vascularizado también puede ser prevenida. Por tanto, el tratamiento tópico de las enfermedades corneales para prevenir la NVC, puede mejorar la supervivencia de una futura queratoplastia.
- b) Prevención secundaria. Si la NVC ya ha ocurrido durante la enfermedad corneal, la prevención secundaria implica la regresión de los vasos previa a la queratoplastia. Esta regresión de los vasos se puede realizar mediante estrategias farmacológicas y físicas (véase *Introducción: 1.4. Tratamiento*

de la neovascularización corneal) o combinadas. Una opción podría consistir, por ejemplo, en la cauterización de los vasos mediante diatermia con aguja fina y la aplicación de un agente antiangiogénico.

Terapia antilinfangiogénica posterior a la queratoplastia:

- c) Prevención terciaria: La NVC postqueratoplastia es un factor de riesgo significativo para subsecuentes reacciones autoinmunes. Así pues, el bloqueo de la angiogénesis tras la queratoplastia puede mejorar la supervivencia del injerto.

En resumen, el advenimiento de fármacos con potenciales efectos antilinfangiogénicos proporciona un campo de nuevos conceptos en el tratamiento de las enfermedades de la superficie ocular. Los IRTQs no solo bloquean la hemangiogénesis secundaria a inflamación sino también la linfangiogénesis corneal y podrían ser capaces de promover la supervivencia del injerto corneal tras un trasplante de córnea.

5.8. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS Y DIRECCIONES FUTURAS

5.8.1. Nuevas técnicas de visualización de los vasos linfáticos

En la clínica, los vasos linfáticos son invisibles al observarlos con lámpara de hendidura al contrario de lo que sucede con los vasos sanguíneos corneales. En un futuro, nuevas técnicas como la microscopía fotónica basada en la autofluorescencia intrínseca de los tejidos y el uso de las tinciones intravitales en la práctica clínica son probables opciones diagnósticas no invasivas funcionales para detectar vasos linfáticos en el contexto de una patología de superficie ocular [320]. La visualización de los vasos linfáticos haría posible analizar la extensión y el potencial incremento o regresión de los mismos durante el seguimiento del trasplante de córnea, tratamiento antiinflamatorio o enfermedades autoinmunes como el ojo seco.

5.8.2. Profundización en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la angiogénesis

El tratamiento de la NVC está cambiando. Para que el tratamiento de la NVC tenga éxito, el estímulo angiogénico que ocurre durante la neovascularización debe ser suprimido y el estímulo antiangiogénico debe ser aumentado.

Durante las dos últimas décadas, paralelo al creciente conocimiento de los eventos moleculares subyacentes en la NV ocular se ha incrementado el interés general por el uso de los agentes anti-VEGF como opciones terapéuticas potentes para el control de la angiogénesis corneal. En este sentido, se espera que los agentes bloqueantes de VEGF o los agentes inhibidores de la tirosina quinasa jueguen un papel importante en el aumento de la supervivencia de los transplantes y la conservación de la visión en los procesos neovasculares del ojo.

En el modelo de NV corneal que hemos desarrollado en el ojo de conejo mediante suturas, nuestros resultados demuestran que los IRTQs utilizados inhiben de forma eficaz la neovascularización, aunque no consiguieron hacer regresar los neovasos previamente formados en los primeros días del tratamiento. Este hecho puede atribuirse, por un lado, al potente estímulo angiogénico que produce el modelo empleado; y por otro lado, a la complejidad de las múltiples vías implicadas en la neovascularización y al actual desconocimiento de otros factores que permitan una regresión vascular completa.

Aunque VEGF ha sido identificado como el mayor estímulo angiogénico responsable de la NVC, otros muchos factores como la angiopoyetina, el PDGF y el TGF- β están implicados. Así pues, dirigirse no solo a VEGF, sino a otros factores de crecimiento puede ser útil en la clínica.

Las vías de señalización que operan en la interacción entre la célula endotelial y el pericito están siendo investigadas y proveerán una información crucial de los mecanismos moleculares paracrinos que controlan la formación del capilar. La búsqueda de fármacos que permitan manipular las interacciones moleculares entre la célula endotelial y el pericito puede proveer a los oftalmólogos de una

potente herramienta capaz de controlar y bloquear la proliferación vascular y la permeabilidad. El futuro de moléculas que interfieran con el complejo célula endotelial-pericito puede ser interesante para el tratamiento de las enfermedades neovasculares del ojo.

Es necesario determinar la concentración segura y efectiva de estas moléculas, el tiempo de exposición de las mismas y las diferentes rutas de administración para acelerar la expansión de estos tratamientos en oftalmología en un futuro próximo.

5.8.3. Diseño de nuevos inhibidores tirosina quinasa

Existen considerables ventajas de los inhibidores tirosina quinasa respecto a otros fármacos (ej. anticuerpos monoclonales) como son el pequeño tamaño de la molécula y su alta potencia.

Existen programas de investigación que emplean tecnología biológica estructural capaces de visualizar a escala atómica las interacciones entre las proteínas y los inhibidores lo que permite una optimización significativa de los fármacos facilitada por estrategias de diseño que enfatizan en la eficacia de los ligamientos proteína-inhibidor.

Hay muchas maneras de medir la actividad quinasa. Los métodos *in vitro* miden la inhibición de la fosforilación del sustrato. Con estos métodos se ha demostrado que muchos inhibidores que se describían *a priori* “selectivos” desarrollan su actividad sobre varias proteínas quinasas. Algunas tienen actividad en miembros de una familia relacionada y otros tienen una actividad más amplia. Sin embargo, muchas han mostrado una alta especificidad respecto al panel de quinasas evaluadas [321].

En un ensayo típico de fosforilación para inhibidores competitivos de ATP reversibles, la potencia del inhibidor se expresa mediante el valor IC_{50} . Esta función mide el grado afinidad intrínseca del inhibidor hacia la quinasa y del grado

de competición del ATP. La codependencia de la potencia del inhibidor en la afinidad intrínseca del inhibidor y la cinética de la enzima respecto a su cofactor, el ATP, puede complicar la interpretación de los estudios *in vitro*. Por otro lado, los ensayos de fosforilación dependen de la quinasa activa para generar un sustrato fosforilado detectable. Este hecho podría complicar la interpretación de los perfiles de selectividad de los inhibidores que se unen y estabilizan las quinasas inactivas [211].

Los ensayos en cultivos celulares pueden dilucidar las limitaciones de los ensayos *in vitro*, puesto que existen casos en los que la selectividad observada en la célula no se corresponde con el perfil de selectividad bioquímica de un inhibidor. Los ensayos *in vitro* asumen que no hay límites en la permeabilidad celular de los compuestos. Una permeabilidad reducida podría disminuir la potencia que se registra posteriormente en los ensayos celulares. Además, la respuesta celular depende de la sensibilidad de la perturbación en red de señalización en la que participa la proteína quinasa inhibida [211].

En conclusión, los patrones de selectividad de la quinasa dan una visión útil para las posibles interacciones de un inhibidor en las que puede participar. Sin embargo, el significado de la selectividad de los patrones debe ser interpretada en el contexto de la biología celular y tisular de las potenciales dianas.

El logro de una selectividad inhibitoria para proteínas quinasas ofrece un cambio en el desarrollo de pequeñas moléculas como herramientas de la investigación química biológica. Medir la selectividad y comprender las características comunes de la unión de inhibidores quinasa no selectivos puede ayudar en el diseño de inhibidores más dirigidos. Si un compuesto inhibe quinasas múltiples, los efectos biológicos pueden no ser atribuibles a las dianas específicas haciendo que su función sea más difícil de dilucidar.

Por otro lado, en el diseño de las moléculas hay que tener en cuenta el efecto del peso molecular en su solubilidad y su penetración dentro de la célula. Muchos inhibidores selectivos y potentes *in vitro* a veces son moléculas de alto

peso molecular que exhiben limitaciones en la solubilidad, penetración de la célula y propiedades farmacocinéticas [218].

La aplicación de diseños híbridos de distintos subtipos de IRTQ es válido como un abordaje prometedor en el diseño de andamios de nuevos inhibidores en el que inhibidores tipo I se unen con segmentos de inhibidores tipo II que se conoce que interactúan en el bolsillo DFG-abierto.

Hay abiertas muchas líneas de investigación en el desarrollo de los inhibidores tirosina quinasa. Algunos grupos se centran en el estudio de quinasas de la misma familia con sitios de unión a ATP similares en sus secuencias. Otros grupos criban la acción de un determinado fármaco sobre una amplia variedad de quinasas para conseguir una vista general de la selectividad del mismo. De hecho, se está observando que compuestos que se consideraban monoespecíficos, no son tan selectivos como se pensaba al principio. Otros investigadores comprueban las diferencias entre los fármacos cuando actúan sobre una o más enzimas de la misma vía de señalización [211].

En resumen, es un hecho que el tratamiento de las enfermedades puede beneficiarse del desarrollo de fármacos controlados mediante la medición y predicción de la selectividad de las pequeñas moléculas inhibitoras de las quinasas siendo esencial este conocimiento en el desarrollo de cada terapia.

5.8.4. Sistemas de liberación de los antiangiogénicos

Optimizar los sistemas de liberación de los fármacos como los IRTQs puede mejorar el tratamiento futuro mediante la administración tópica para el tratamiento de la NV de la córnea o del segmento posterior del ojo, o bien, una menor frecuencia de las inyecciones intravítreas.

Con este fin, Robbie y coautores exploraron la hipótesis de que los fármacos que se unen a la melanina que tienen como diana la vía de señalización de VEGF son retenidos en la úvea pigmentada y funcionan con un depósito del fármaco de liberación en el fondo de ojo [322]. Esta estrategia se está actualmente

explorando con IRTQ para el tratamiento de neovascularización ocular y se basa en las propiedades específicas de unión a la melanina del compuesto que debe favorecer la liberación y, sobretodo, el mantenimiento de la bioactividad después de la liberación desde las células a la parte posterior del ojo [323]. Estas propiedades pueden no ser intrínsecas para una particular clase de compuestos, pero podrían ser potencialmente diseñados dentro de una molécula que actúen como vehículos capaces de liberar el depósito. Este nuevo mecanismo podría permitir en un futuro el tratamiento de la DMAE a través de una sencilla y no invasiva administración vía oral de pequeñas cantidades de este fármaco. La liberación tópica sería otra prometedora estrategia de liberación de este tipo fármacos con capacidad potencial para unirse a la úvea [324]. Estos hechos resaltan la necesidad de exploraciones futuras en la utilidad de la melanina o el concepto de depósito uveal esencialmente cuando se combina con una administración tópica.

5.8.5. Uso de los IRTQs en combinación con otros antiangiogénicos

Considerando las complejas interacciones de la patogénesis de la neovascularización corneal, es necesario un enfoque multifacético para su prevención, quizás usando varios de los tratamientos existentes (*véase Introducción: 1.4. Tratamiento de la neovascularización corneal*).

En teoría, la combinación de varios métodos terapéuticos dirigidos a los diferentes mecanismos que sostienen la angiogénesis puede resultar más eficaz en la prevención de la NVC. Por otro lado, el tratamiento combinado permitiría reducir las dosis de los fármacos para reducir los potenciales efectos adversos.

La combinación de la aplicación de laserterapia con la terapia antiangiogénica permitiría, por un lado, que el láser de argón mediante la coagulación cierre los neovasos córneaes y, por otro lado, los agentes anti-VEGF prevengan la angiogénesis posterior.

Las terapias o cócteles de varios IRTQs o la combinación con otros agentes antiangiogénicos representan un nuevo concepto terapéutico emergente. Este abordaje mediante la combinación de fármacos ha resultado ser más flexible en

términos de selección dirigida y diseño terapéutico que el uso de proteínas inhibidoras multidiana, porque los agentes terapéuticos combinados que presentan diferentes modos de acción biológicos pueden ser administrados a diferentes concentraciones y en distintos tiempos optimizando la respuesta.

5.8.6. Estudios futuros con vatalanib y axitinib

Los IRTQ son agentes farmacológicos potentes que pueden inhibir la inflamación y la neovascularización corneal. Con el advenimiento de estas nuevas terapias, podríamos ser capaces de evitar la opacidad corneal y encontrar una vía efectiva para permitir un trasplante de córnea en aquellos pacientes que han sido considerados con alto riesgo de rechazo y fracaso del injerto corneal.

Este estudio ha mostrado que vatalanib y axitinib, administrados tópicamente y sin efectos secundarios significativos, puede ser un nuevo tratamiento interesante para el tratamiento de la NVC y podrían representar una terapia alternativa en casos donde el tratamiento convencional ha fallado.

Para determinar los niveles de vatalanib y axitinib óptimos requeridos para bloquear la acción de VEGF, serán necesarias futuras investigaciones in vivo que incluyan mediciones de los niveles de VEGF en los tejidos oculares para las diferentes concentraciones de los fármacos. Además, será necesario determinar cómo estos inhibidores de la tirosina quinasa afectan a la expresión de otros factores angioregulatorios implicados en la NVC.

Pero antes del inicio de los ensayos clínicos será necesario investigar sobre los posibles efectos y toxicidad de estas sustancias. En este contexto es de obligatoria necesidad la realización de ensayos clínicos controlados y aleatorizados para establecer la efectividad y seguridad de los regímenes de tratamiento de estos agentes.

6.

CONCLUSIONES

En base a la hipótesis y objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral, a tenor de los resultados obtenidos y su posterior discusión hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La administración tópica de vatalanib (IRTQ tipo I) con capacidad para inhibir los receptores de VEGF (VEGFR-1 y VEGFR-2) principalmente y los receptores de PDGF, en el animal de experimentación y a las dosis utilizadas, en comparación con el placebo, inhibe los neovasos corneales inducidos por un modelo de suturas.
2. La administración tópica de axitinib (IRTQ tipo II), con capacidad de bloquear selectivamente los receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3) e inhibir los receptores de PDGF, en el animal de experimentación y a las dosis utilizadas, en comparación con el placebo, inhibe los neovasos corneales inducidos por un modelo de suturas.
3. Las concentraciones más altas de cada fármaco presentan mayor eficacia en la inhibición de la neovascularización corneal que las concentraciones menores.
4. En base al papel crucial que desempeña VEGF en la angiogénesis, en nuestro modelo de NVC, la administración tópica de axitinib 0,5 mg/ml y vatalanib 3,5mg/ml produjo una inhibición del 83,74% y del 61,20%, respectivamente. Siendo la inhibición de la neovascularización corneal inducida por axitinib de alta concentración 1,36 veces más intensa que la de vatalanib de alta concentración. Por tanto, la administración tópica de **axitinib** produce una mayor inhibición vascular que **vatalanib**.
5. Los inhibidores de los receptores tirosina quinasa a las concentraciones estudiadas inducen cambios en la morfología del árbol vascular y reducen la microdensidad vascular pero no producen cambios significativos en el calibre de los vasos.

6. La administración tópica de cada angiogénico no induce efectos secundarios detectables clínicamente.

En resumen, la administración tópica de los fármacos utilizados (vatalanib y axitinib) en un modelo experimental animal de neovascularización corneal inducido mediante suturas, inhibe la formación de neovasos corneales a través del bloqueo multidiaria de los receptores tirosina quinasa de los factores proangiogénicos VEGF y PDGF.

Finalmente, los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran a los inhibidores de la tirosina quinasa, mediante administración tópica, como un nuevo concepto terapéutico emergente que ofrece la posibilidad de tratamientos prometedores para las enfermedades neovasculares del ojo. No obstante, serán necesarios ensayos prospectivos y aleatorizados para determinar su eficacia y seguridad en humanos, así como las dosis ideales y la duración del tratamiento.

7.

BIBLIOGRAFÍA

1. Choi DM, Thompson RW, Jr., Price FW, Jr.: **Incisional refractive surgery**. *Curr Opin Ophthalmol* 2002, **13**(4):237-241.
2. Duke-Elder S. WKC: **The anatomy of the visual system**. In: *System of ophthalmology. Volume 2*, edn. Edited by S. D-E. London: Henry Kimpton; 1961: 96-131.
3. Bennett AG, Rabbets RB: **The schematic eye**. In: *Clinical visual optics*. edn. Edited by Bennett AG, Rabbets RB: Butterworth-Heinemann; 1998: 207-228.
4. Doughty MJ, Zaman ML: **Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach**. *Surv Ophthalmol* 2000, **44**(5):367-408.
5. Li HF, Petroll WM, Moller-Pedersen T, Maurer JK, Cavanagh HD, Jester JV: **Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF)**. *Curr Eye Res* 1997, **16**(3):214-221.
6. Duran de la Colina J.A.: **Anatomofisiología de la córnea**. In: *Complicaciones de las lentes de contacto*. edn. Edited by J.A. DdIC. Madrid: MAC LINE; 1998: 13-27.
7. Kruse FE: **Stem cells and corneal epithelial regeneration**. *Eye (Lond)* 1994, **8** (Pt 2):170-183.
8. Zieske JD: **Perpetuation of stem cells in the eye**. *Eye (Lond)* 1994, **8** (Pt 2):163-169.
9. Lagali N, Germundsson J, Fagerholm P: **The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: a prospective study using in vivo confocal microscopy**. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009, **50**(9):4192-4198.
10. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J: **Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer)**. *Ophthalmology* 2013, **120**(9):1778-1785.
11. Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ: **The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas**. *Arch Ophthalmol* 1982, **100**(12):1942-1947.
12. Belmonte C, Acosta MC, Gallar J: **Neural basis of sensation in intact and injured corneas**. *Exp Eye Res* 2004, **78**(3):513-525.

13. Dua HS, Gomes JA, Jindal VK, Appa SN, Schwarting R, Eagle RC, Jr., Donoso LA, Laibson PR: **Mucosa specific lymphocytes in the human conjunctiva, corneoscleral limbus and lacrimal gland.** *Curr Eye Res* 1994, **13**(1):87-93.
14. Gipson IK, Watanabe H, Zieske JD: **Corneal wound healing and fibronectin.** *Int Ophthalmol Clin* 1993, **33**(4):149-163.
15. Azar DT: **Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis).** *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006, **104**:264-302.
16. Conn H, Berman M, Kenyon K, Langer R, Gage J: **Stromal vascularization prevents corneal ulceration.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980, **19**(4):362-370.
17. Lee P, Wang CC, Adamis AP: **Ocular neovascularization: an epidemiologic review.** *Surv Ophthalmol* 1998, **43**(3):245-269.
18. Dana MR, Streilein JW: **Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, **37**(12):2485-2494.
19. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C: **Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: an evidence-based meta-analysis.** *Ophthalmology* 2010, **117**(7):1300-1305 e1307.
20. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT: **Corneal neovascularization.** *Curr Opin Ophthalmol* 2001, **12**(4):242-249.
21. Zhang SX, Ma JX: **Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy.** *Prog Retin Eye Res* 2007, **26**(1):1-37.
22. Arffa RC: **Historia y exploración.** In: *Grayson - Enfermedades de la córnea.* edn. Edited by Arffa RC. Madrid: Harcourt-Brace; 1999.
23. World Health Organization: **Future approaches to trachoma control : report of a global scientific meeting, Geneva, 17-20 June 1996.** In: *Global Scientific Meeting on Futures Approaches to Trachoma Control- Programme for the Prevention of Blindness and Deafness.* Geneva: World Health Organization; 1997: 44p.
24. Solomon AW, Zondevar M., Kuper H., Buchan J., Mabey D.C.W., Foster A.: **Trachoma control: a guide for programme managers.** Geneva: World Health Organization; 2006.
25. Rickert B. CISO: **Protecting surface water for health.** Geneve: World health Organization; 2016.
26. Coffeng LE, Stolk WA, Zoure HG, Veerman JL, Agblewonus KB, Murdoch ME, Noma M, Fobi G, Richardus JH, Bundy DA *et al*: **African programme for**

- onchocerciasis control 1995-2015: updated health impact estimates based on new disability weights.** *PLoS Negl Trop Dis* 2014, **8**(6):e2759.
27. Gris O, Del Campo Z: **Queratitis Herpética.** In: *Queratitis Infecciosas.* edn. Edited by Pérez-Santonja JJ, Hervás Hernandis JM. Madrid: Ergon; 2006: 135-158.
28. Negrel AD, Thylefors B: **The global impact of eye injuries.** *Ophthalmic Epidemiol* 1998, **5**(3):143-169.
29. Lim P, Fuchsluger TA, Jurkunas UV: **Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization.** *Semin Ophthalmol* 2009, **24**(3):139-148.
30. Mochimaru H, Usui T, Yaguchi T, Nagahama Y, Hasegawa G, Usui Y, Shimmura S, Tsubota K, Amano S, Kawakami Y *et al*: **Suppression of alkali burn-induced corneal neovascularization by dendritic cell vaccination targeting VEGF receptor 2.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, **49**(5):2172-2177.
31. Applegate LA, Ley RD: **DNA damage is involved in the induction of opacification and neovascularization of the cornea by ultraviolet radiation.** *Exp Eye Res* 1991, **52**(4):493-497.
32. Said DG, Mathew M, Shaikh MY, Maharajan VS, Lowe J, Dua HS: **Diffuse keratoconjunctival proliferation: a novel clinical manifestation.** *Arch Ophthalmol* 2008, **126**(9):1226-1232.
33. Dua HS, Azuara-Blanco A: **Limbal stem cells of the corneal epithelium.** *Surv Ophthalmol* 2000, **44**(5):415-425.
34. Suchecki JK, Donshik P, Ehlers WH: **Contact lens complications.** *Ophthalmol Clin North Am* 2003, **16**(3):471-484.
35. Safvati A, Cole N, Hume E, Willcox M: **Mediators of neovascularization and the hypoxic cornea.** *Curr Eye Res* 2009, **34**(6):501-514.
36. Donnenfeld ED, Ingraham H, Perry HD, Imundo M, Goldberg LP: **Contact lens-related deep stromal intracorneal hemorrhage.** *Ophthalmology* 1991, **98**(12):1793-1796.
37. Thiel MA, Coster DJ, Williams KA: **The potential of antibody-based immunosuppressive agents for corneal transplantation.** *Immunol Cell Biol* 2003, **81**(2):93-105.
38. Rocha G, Deschenes J, Rowsey JJ: **The immunology of corneal graft rejection.** *Crit Rev Immunol* 1998, **18**(4):305-325.
39. Dana MR: **Angiogenesis and lymphangiogenesis-implications for corneal immunity.** *Semin Ophthalmol* 2006, **21**(1):19-22.
40. Sit M, Weisbrod DJ, Naor J, Slomovic AR: **Corneal graft outcome study.** *Cornea* 2001, **20**(2):129-133.

41. Maguire MG, Stark WJ, Gottsch JD, Stulting RD, Sugar A, Fink NE, Schwartz A: **Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group.** *Ophthalmology* 1994, **101**(9):1536-1547.
42. Bachmann BO, Bock F, Wiegand SJ, Maruyama K, Dana MR, Kruse FE, Luetjen-Drecoll E, Cursiefen C: **Promotion of graft survival by vascular endothelial growth factor a neutralization after high-risk corneal transplantation.** *Arch Ophthalmol* 2008, **126**(1):71-77.
43. Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F: **Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny.** *Development* 1989, **105**(3):473-485.
44. Risau W: **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature* 1997, **386**(6626):671-674.
45. Folkman J: **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.** *Nat Med* 1995, **1**(1):27-31.
46. Hanahan D, Folkman J: **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** *Cell* 1996, **86**(3):353-364.
47. Carmeliet P, Jain RK: **Angiogenesis in cancer and other diseases.** *Nature* 2000, **407**(6801):249-257.
48. Van Buskirk EM: **The anatomy of the limbus.** *Eye (Lond)* 1989, **3 (Pt 2)**:101-108.
49. Cursiefen C, Hofmann-Rummelt C, Kuchle M, Schlotzer-Schrehardt U: **Pericyte recruitment in human corneal angiogenesis: an ultrastructural study with clinicopathological correlation.** *Br J Ophthalmol* 2003, **87**(1):101-106.
50. Truong A, Wong TY, Khachigian LM: **Emerging therapeutic approaches in the management of retinal angiogenesis and edema.** *J Mol Med (Berl)* 2011, **89**(4):343-361.
51. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO: **Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease.** *Prog Retin Eye Res* 2003, **22**(1):1-29.
52. Kvant A: **Ocular angiogenesis: the role of growth factors.** *Acta Ophthalmol Scand* 2006, **84**(3):282-288.
53. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P *et al*: **Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis.** *Nature* 1998, **394**(6692):485-490.
54. Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P: **Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer.** *J Clin Invest* 2013, **123**(8):3190-3200.

-
55. Bock F, Maruyama K, Regenfuss B, Hos D, Steven P, Heindl LM, Cursiefen C: **Novel anti(lymph)angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases.** *Prog Retin Eye Res* 2013, **34**:89-124.
 56. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H: **Behavior of postcapillary venule pericytes during postnatal angiogenesis.** *J Morphol* 1992, **213**(1):33-45.
 57. Nehls V, Denzer K, Drenckhahn D: **Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ.** *Cell Tissue Res* 1992, **270**(3):469-474.
 58. Eilken HM, Adams RH: **Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis.** *Curr Opin Cell Biol* 2010, **22**(5):617-625.
 59. Chappell JC, Wiley DM, Bautch VL: **Regulation of blood vessel sprouting.** *Semin Cell Dev Biol* 2011, **22**(9):1005-1011.
 60. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A *et al*: **Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**(10):943-953.
 61. Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, Ondr JK, Rao S, Lang RA, Thurston G *et al*: **Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis.** *Dev Cell* 2009, **16**(1):70-82.
 62. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhij S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C: **Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction.** *Blood* 2010, **116**(5):829-840.
 63. Eichmann A, Simons M: **VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond.** *Curr Opin Cell Biol* 2012, **24**(2):188-193.
 64. Ribatti D, Nico B, Crivellato E: **The role of pericytes in angiogenesis.** *Int J Dev Biol* 2011, **55**(3):261-268.
 65. von Tell D, Armulik A, Betsholtz C: **Pericytes and vascular stability.** *Exp Cell Res* 2006, **312**(5):623-629.
 66. Hughes CC: **Endothelial-stromal interactions in angiogenesis.** *Curr Opin Hematol* 2008, **15**(3):204-209.
 67. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE: **Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation.** *Blood* 2009, **114**(24):5091-5101.
 68. Cursiefen C: **Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea.** *Chem Immunol Allergy* 2007, **92**:50-57.

69. Cursiefen C, Maruyama K, Jackson DG, Streilein JW, Kruse FE: **Time course of angiogenesis and lymphangiogenesis after brief corneal inflammation.** *Cornea* 2006, **25**(4):443-447.
70. Ma DH, Tsai RJ, Chu WK, Kao CH, Chen JK: **Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, **40**(8):1822-1828.
71. Raffetto JD, Khalil RA: **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease.** *Biochem Pharmacol* 2008, **75**(2):346-359.
72. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, Albuquerque RJ, Richter E, Sakurai E, Newcomb MT *et al*: **Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1.** *Nature* 2006, **443**(7114):993-997.
73. Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, Baffi JZ, Yamada K, Kaneko H, Green MG *et al*: **Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth.** *Nat Med* 2009, **15**(9):1023-1030.
74. Chung ES, Chauhan SK, Jin Y, Nakao S, Hafezi-Moghadam A, van Rooijen N, Zhang Q, Chen L, Dana R: **Contribution of macrophages to angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor-3-specific ligands.** *Am J Pathol* 2009, **175**(5):1984-1992.
75. Beebe DC: **Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues.** *Semin Cell Dev Biol* 2008, **19**(2):125-133.
76. Jain RK: **Molecular regulation of vessel maturation.** *Nat Med* 2003, **9**(6):685-693.
77. Pepper MS: **Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, **21**(7):1104-1117.
78. Yeh SI, Han KY, Sabri A, Rosenblatt MI, Azar DT, Jain S, Chang JH: **MMP-7 knock-in corneal fibroblast cell lines secrete MMP-7 with proteolytic activity towards collagen XVIII.** *Curr Eye Res* 2010, **35**(9):799-805.
79. Vassalli JD, Sappino AP, Belin D: **The plasminogen activator/plasmin system.** *J Clin Invest* 1991, **88**(4):1067-1072.
80. Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M: **Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1.** *J Biol Chem* 1996, **271**(45):28220-28228.

81. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A: **The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(5):361-370.
82. Schlessinger J: **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** *Cell* 2000, **103**(2):211-225.
83. Taleisnik S: **Receptores asociados a enzimas.** In: *Receptores celulares y la transducción de señales.* edn. Edited by S. T. Córdoba, Argentina: Encuentro Grupo Editor; 2006: 63-96.
84. Gotink KJ, Verheul HM: **Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?** *Angiogenesis* 2010, **13**(1):1-14.
85. Kolch W: **Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions.** *Biochem J* 2000, **351 Pt 2**:289-305.
86. Taleisnik S: **Sistemas mediados por el efector fosfolipasa C.** In: *Receptores celulares y la transducción de Señales.* edn. Edited by S. T. Córdoba- Argentina: Encuentro Grupo Editor; 2006: 43-62.
87. Toker A: **Signaling through protein kinase C.** *Front Biosci* 1998, **3**:D1134-1147.
88. Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D: **Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**(22):7758-7768.
89. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM: **Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors.** *J Anat* 2002, **200**(6):581-597.
90. Taleisnik S: **Fosfolípidos.** In: *Receptores celulares y la transducción de señales.* edn. Edited by S. T. Córdoba, Argentina: Encuentro Grupo Editor; 2006: 119-126.
91. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA: **Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations.** *Drug Resist Updat* 2008, **11**(1-2):32-50.
92. Carmeliet P, Jain RK: **Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis.** *Nature* 2011, **473**(7347):298-307.
93. Ferrara N: **Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress.** *Endocr Rev* 2004, **25**(4):581-611.
94. Shakiba Y, Mansouri K, Arshadi D, Rezaei N: **Corneal neovascularization: molecular events and therapeutic options.** *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009, **3**(3):221-231.
95. Robinson CJ, Stringer SE: **The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 5):853-865.
96. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: **The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein**

- forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991, **266**(18):11947-11954.
97. Gitay-Goren H, Soker S, Vlodavsky I, Neufeld G: **The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules.** *J Biol Chem* 1992, **267**(9):6093-6098.
98. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: **Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms.** *J Biol Chem* 1992, **267**(36):26031-26037.
99. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: **The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.** *Mol Endocrinol* 1991, **5**(12):1806-1814.
100. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM: **Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(14):7192-7197.
101. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P: **FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**(12):942-956.
102. Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, van Meeteren LA, Samén E, Lu L, Vanwildemeersch M *et al*: **Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake.** *Nature* 2010, **464**(7290):917-921.
103. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U: **Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(6):2576-2581.
104. Achen MG, Stacker SA: **The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature.** *Int J Exp Pathol* 1998, **79**(5):255-265.
105. Lutun A, Carmeliet G, Carmeliet P: **Vascular progenitors: from biology to treatment.** *Trends Cardiovasc Med* 2002, **12**(2):88-96.
106. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ: **Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus.** *J Virol* 1994, **68**(1):84-92.
107. Shibuya M: **Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis.** *Cell Struct Funct* 2001, **26**(1):25-35.

108. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D *et al*: **VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia.** *J Cell Biol* 2003, **161**(6):1163-1177.
109. Benedito R, Rocha SF, Woeste M, Zamykal M, Radtke F, Casanovas O, Duarte A, Pytowski B, Adams RH: **Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling.** *Nature* 2012, **484**(7392):110-114.
110. Gerhardt H, Ruhrberg C, Abramsson A, Fujisawa H, Shima D, Betsholtz C: **Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system.** *Dev Dyn* 2004, **231**(3):503-509.
111. Bochenek ML, Dickinson S, Astin JW, Adams RH, Nobes CD: **Ephrin-B2 regulates endothelial cell morphology and motility independently of Eph-receptor binding.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 8):1235-1246.
112. Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, Acker T, Acker-Palmer A: **Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis.** *Nature* 2010, **465**(7297):487-491.
113. Tvorogov D, Anisimov A, Zheng W, Leppanen VM, Tammela T, Laurinavicius S, Holnthoner W, Helotera H, Holopainen T, Jeltsch M *et al*: **Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization.** *Cancer Cell* 2010, **18**(6):630-640.
114. Tammela T, Alitalo K: **Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise.** *Cell* 2010, **140**(4):460-476.
115. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: **The biology of VEGF and its receptors.** *Nat Med* 2003, **9**(6):669-676.
116. Roberts WG, Palade GE: **Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor.** *J Cell Sci* 1995, **108** (Pt 6):2369-2379.
117. Dvorak HF: **Angiogenesis: update 2005.** *J Thromb Haemost* 2005, **3**(8):1835-1842.
118. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **181**(2):902-906.
119. Siemerink MJ, Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO: **Endothelial tip cells in ocular angiogenesis: potential target for anti-angiogenesis therapy.** *J Histochem Cytochem* 2013, **61**(2):101-115.

120. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N: **Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation.** *J Biol Chem* 1998, **273**(46):30336-30343.
121. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E: **Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal.** *J Clin Invest* 1999, **103**(2):159-165.
122. Bautch VL, Redick SD, Scalia A, Harmaty M, Carmeliet P, Rapoport R: **Characterization of the vasculogenic block in the absence of vascular endothelial growth factor-A.** *Blood* 2000, **95**(6):1979-1987.
123. Ferrara N: **VEGF and Intraocular Neovascularization: From Discovery to Therapy.** *Transl Vis Sci Technol* 2016, **5**(2):10.
124. Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S: **Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, **37**(9):1929-1934.
125. Philipp W, Speicher L, Humpel C: **Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**(9):2514-2522.
126. Hoch RV, Soriano P: **Roles of PDGF in animal development.** *Development* 2003, **130**(20):4769-4784.
127. Heldin CH, Westermark B: **Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor.** *Physiol Rev* 1999, **79**(4):1283-1316.
128. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C: **Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine.** *Genes Dev* 2008, **22**(10):1276-1312.
129. Hellberg C, Ostman A, Heldin CH: **PDGF and vessel maturation.** *Recent Results Cancer Res* 2010, **180**:103-114.
130. Quaegebeur A, Segura I, Carmeliet P: **Pericytes: blood-brain barrier safeguards against neurodegeneration?** *Neuron* 2010, **68**(3):321-323.
131. Demoulin JB, Montano-Almendras CP: **Platelet-derived growth factors and their receptors in normal and malignant hematopoiesis.** *Am J Blood Res* 2012, **2**(1):44-56.
132. Heldin CH: **Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment.** *Cell Commun Signal* 2013, **11**:97.
133. Hammes HP, Feng Y, Pfister F, Brownlee M: **Diabetic retinopathy: targeting vasoregression.** *Diabetes* 2011, **60**(1):9-16.

-
134. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C: **Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities.** *Genes Dev* 1994, **8**(16):1875-1887.
135. Soriano P: **Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice.** *Genes Dev* 1994, **8**(16):1888-1896.
136. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Schepke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N *et al*: **A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation.** *Nature* 2008, **456**(7223):809-813.
137. Dell S, Peters S, Muther P, Kociok N, Jousseaume AM: **The role of PDGF receptor inhibitors and PI3-kinase signaling in the pathogenesis of corneal neovascularization.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, **47**(5):1928-1937.
138. Virakul S, van Steensel L, Dalm VA, Paridaens D, van Hagen PM, Dik WA: **Platelet-derived growth factor: a key factor in the pathogenesis of graves' ophthalmopathy and potential target for treatment.** *Eur Thyroid J* 2014, **3**(4):217-226.
139. Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N, Hammes HP, Shani M, Fassler R, Betsholtz C: **Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy.** *EMBO J* 2002, **21**(16):4307-4316.
140. Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S, Abramsson A, Enge M, Hellstrom M, Backstrom G, Fredriksson S, Landegren U, Nystrom HC *et al*: **Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall.** *Genes Dev* 2003, **17**(15):1835-1840.
141. Edqvist PH, Niklasson M, Vidal-Sanz M, Hallbook F, Forsberg-Nilsson K: **Platelet-derived growth factor over-expression in retinal progenitors results in abnormal retinal vessel formation.** *PLoS One* 2012, **7**(8):e42488.
142. Pennock S, Rheaume MA, Mukai S, Kazlauskas A: **A novel strategy to develop therapeutic approaches to prevent proliferative vitreoretinopathy.** *Am J Pathol* 2011, **179**(6):2931-2940.
143. Reneker LW, Overbeek PA: **Lens-specific expression of PDGF-A in transgenic mice results in retinal astrocytic hamartomas.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, **37**(12):2455-2466.
144. Chong RS, Osborne A, Conceicao R, Martin KR: **Platelet-Derived Growth Factor Preserves Retinal Synapses in a Rat Model of Ocular Hypertension.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016, **57**(3):842-852.

145. Kim WJ, Mohan RR, Mohan RR, Wilson SE: **Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, **40**(7):1364-1372.
146. Dickson C, Spencer-Dene B, Dillon C, Fantl V: **Tyrosine kinase signalling in breast cancer: fibroblast growth factors and their receptors.** *Breast Cancer Res* 2000, **2**(3):191-196.
147. Ornitz DM, Itoh N: **Fibroblast growth factors.** *Genome Biol* 2001, **2**(3):REVIEWS3005.
148. Beenken A, Mohammadi M: **The FGF family: biology, pathophysiology and therapy.** *Nat Rev Drug Discov* 2009, **8**(3):235-253.
149. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM: **Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor.** *Cell* 1991, **64**(4):841-848.
150. Roghani M, Moscatelli D: **Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms.** *J Biol Chem* 1992, **267**(31):22156-22162.
151. Li J, Zhang YP, Kirsner RS: **Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix.** *Microsc Res Tech* 2003, **60**(1):107-114.
152. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C: **Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(6):2260-2268.
153. Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, Sugimoto T, Kaji K, Utsuyama M, Kurashima C *et al*: **Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor.** *Science* 1992, **257**(5075):1401-1403.
154. Murakami M, Nguyen LT, Zhuang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan RV, Simons M: **The FGF system has a key role in regulating vascular integrity.** *J Clin Invest* 2008, **118**(10):3355-3366.
155. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM: **Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo.** *Circulation* 1995, **92**(9 Suppl):II365-371.
156. Frank RN, Amin RH, Elliott D, Puklin JE, Abrams GW: **Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes.** *Am J Ophthalmol* 1996, **122**(3):393-403.

157. Rao RC, Varani J, Soong HK: **FGF promotes corneal stromal fibroblast motility.** *J Ocul Pharmacol* 1992, **8**(1):77-81.
158. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, Fayein NA, Glaser B, Coscas G, Courtois Y, Jeanny JC: **Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990, **31**(2):323-333.
159. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K: **Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(3):165-177.
160. Fiedler U, Augustin HG: **Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation.** *Trends Immunol* 2006, **27**(12):552-558.
161. Master Z, Jones N, Tran J, Jones J, Kerbel RS, Dumont DJ: **Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak.** *EMBO J* 2001, **20**(21):5919-5928.
162. Cascone I, Audero E, Giraud E, Napione L, Maniero F, Philips MR, Collard JG, Serini G, Bussolino F: **Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiopoietin-1.** *Blood* 2003, **102**(7):2482-2490.
163. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N *et al*: **Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.** *Science* 1997, **277**(5322):55-60.
164. Loughna S, Sato TN: **Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development.** *Matrix Biol* 2001, **20**(5-6):319-325.
165. Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF, Detmar M, Dvorak HF: **Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo.** *Lab Invest* 2002, **82**(4):387-401.
166. del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, Breant C, Duarte A, Takakura N, Fukamizu A *et al*: **Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes.** *Blood* 2010, **116**(19):4025-4033.
167. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L: **Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors.** *Cancer Cell* 2005, **8**(3):211-226.
168. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM: **Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2,**

- modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998, **83**(3):233-240.
169. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA: **Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(17):11205-11210.
170. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Takahashi K, Umeda N, Shen J, Dong A, Apte RS, Duh E *et al*: **Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive.** *FASEB J* 2005, **19**(8):963-965.
171. Nambu H, Umeda N, Kachi S, Oshima Y, Akiyama H, Nambu R, Campochiaro PA: **Angiopoietin 1 prevents retinal detachment in an aggressive model of proliferative retinopathy, but has no effect on established neovascularization.** *J Cell Physiol* 2005, **204**(1):227-235.
172. Campochiaro PA: **Ocular neovascularization.** *J Mol Med (Berl)* 2013, **91**(3):311-321.
173. Gupta D, Illingworth C: **Treatments for corneal neovascularization: a review.** *Cornea* 2011, **30**(8):927-938.
174. Dana MR, Zhu SN, Yamada J: **Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization.** *Cornea* 1998, **17**(4):403-409.
175. Demir T, Celiker UO, Kukner A, Mogulkoc R, Celebi S, Celiker H: **Effect of Octreotide on experimental corneal neovascularization.** *Acta Ophthalmol Scand* 1999, **77**(4):386-390.
176. Kim JH, Kim JC, Shin SH, Chang SI, Lee HS, Chung SI: **The inhibitory effects of recombinant plasminogen kringle 1-3 on the neovascularization of rabbit cornea induced by angiogenin, bFGF, and VEGF.** *Exp Mol Med* 1999, **31**(4):203-209.
177. Klauber N, Browne F, Anand-Apte B, D'Amato RJ: **New activity of spironolactone. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo.** *Circulation* 1996, **94**(10):2566-2571.
178. Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ: **Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization.** *Exp Eye Res* 1997, **64**(6):971-978.
179. Sood AK, Gupta B, Chugh P: **Topical amiloride accelerates healing and delays neovascularization in mechanically produced corneal ulcers in rabbits.** *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999, **21**(7):491-497.
180. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR: **Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis.** *Mol Med* 1998, **4**(6):376-383.

181. Cursiefen C, Viaud E, Bock F, Geudelin B, Ferry A, Kadlecova P, Levy M, Al Mahmood S, Colin S, Thorin E *et al*: **Aganirsen antisense oligonucleotide eye drops inhibit keratitis-induced corneal neovascularization and reduce need for transplantation: the I-CAN study**. *Ophthalmology* 2014, **121**(9):1683-1692.
182. Yamada M, Kawai M, Kawai Y, Mashima Y: **The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat**. *Curr Eye Res* 1999, **19**(4):300-304.
183. Castro MR, Lutz D, Edelman JL: **Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization**. *Exp Eye Res* 2004, **79**(2):275-285.
184. Heiligenhaus A, Steuhl KP: **Treatment of HSV-1 stromal keratitis with topical cyclosporin A: a pilot study**. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999, **237**(5):435-438.
185. Sonmez B, Beden U, Erkan D: **Regression of severe corneal stromal neovascularization with topical cyclosporine 0.05% after penetrating keratoplasty for fungal corneal ulcer**. *Int Ophthalmol* 2009, **29**(2):123-125.
186. Kachi S, Hirano K, Takesue Y, Miura M: **Unusual corneal deposit after the topical use of cyclosporine as eyedrops**. *Am J Ophthalmol* 2000, **130**(5):667-669.
187. Koenig Y, Bock F, Horn F, Kruse F, Straub K, Cursiefen C: **Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin) eye drops against corneal neovascularization**. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009, **247**(10):1375-1382.
188. Dastjerdi MH, Al-Arfaj KM, Nallasamy N, Hamrah P, Jurkunas UV, Pineda R, 2nd, Pavan-Langston D, Dana R: **Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study**. *Arch Ophthalmol* 2009, **127**(4):381-389.
189. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A: **Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization**. *Cornea* 2008, **27**(2):142-147.
190. Zaki AA, Farid SF: **Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization**. *Acta Ophthalmol* 2010, **88**(8):868-871.
191. Ferrari G, Dastjerdi MH, Okanobo A, Cheng SF, Amparo F, Nallasamy N, Dana R: **Topical ranibizumab as a treatment of corneal neovascularization**. *Cornea* 2013, **32**(7):992-997.
192. Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim TI: **The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization**. *Ophthalmology* 2008, **115**(6):e33-38.

193. Maddula S, Davis DK, Maddula S, Burrow MK, Ambati BK: **Horizons in therapy for corneal angiogenesis.** *Ophthalmology* 2011, **118**(3):591-599.
194. Fossarello M, Peiretti E, Zucca I, Serra A: **Photodynamic therapy of corneal neovascularization with verteporfin.** *Cornea* 2003, **22**(5):485-488.
195. Yoon KC, You IC, Kang IS, Im SK, Ahn JK, Park YG, Ahn KY: **Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization.** *Am J Ophthalmol* 2007, **144**(3):390-395.
196. You IC, Im SK, Lee SH, Yoon KC: **Photodynamic therapy with verteporfin combined with subconjunctival injection of bevacizumab for corneal neovascularization.** *Cornea* 2011, **30**(1):30-33.
197. Pillai CT, Dua HS, Hossain P: **Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**(8):2148-2153.
198. Wertheim MS, Cook SD, Knox-Cartwright NE, Van DL, Tole DM: **Electrolysis-needle cauterization of corneal vessels in patients with lipid keratopathy.** *Cornea* 2007, **26**(2):230-231.
199. Thatte S: **Fine needle diathermy - a choice for managing corneal vascularization.** *Nepal J Ophthalmol* 2011, **3**(1):23-26.
200. Kenyon KR: **Limbal autograft transplantation for chemical and thermal burns.** *Dev Ophthalmol* 1989, **18**:53-58.
201. Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, Ti SE, Goto E, Feuer WJ, Tseng SC: **Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency.** *Ophthalmology* 2002, **109**(6):1159-1166.
202. Ono K, Yokoo S, Mimura T, Usui T, Miyata K, Araie M, Yamagami S, Amano S: **Autologous transplantation of conjunctival epithelial cells cultured on amniotic membrane in a rabbit model.** *Mol Vis* 2007, **13**:1138-1143.
203. Ang LP, Tanioka H, Kawasaki S, Ang LP, Yamasaki K, Do TP, Thein ZM, Koizumi N, Nakamura T, Yokoi N *et al*: **Cultivated human conjunctival epithelial transplantation for total limbal stem cell deficiency.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, **51**(2):758-764.
204. Cauchi PA, Ang GS, Azuara-Blanco A, Burr JM: **A systematic literature review of surgical interventions for limbal stem cell deficiency in humans.** *Am J Ophthalmol* 2008, **146**(2):251-259.
205. Kheirikhah A, Johnson DA, Paranjpe DR, Raju VK, Casas V, Tseng SC: **Temporary sutureless amniotic membrane patch for acute alkaline burns.** *Arch Ophthalmol* 2008, **126**(8):1059-1066.

206. Manning BD, Cantley LC: **Hitting the target: emerging technologies in the search for kinase substrates.** *Sci STKE* 2002, **2002**(162):pe49.
207. Li R, J.A. S: **Kinase inhibitors drugs**, 1 edn: Wiley; 2009.
208. Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR, Connors RW, Bridges AJ: **A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase.** *Science* 1994, **265**(5175):1093-1095.
209. Zhang Z, Meier KE: **New assignments for multitasking signal transduction inhibitors.** *Mol Pharmacol* 2006, **69**(5):1510-1512.
210. Gribble FM, Loussouarn G, Tucker SJ, Zhao C, Nichols CG, Ashcroft FM: **A novel method for measurement of submembrane ATP concentration.** *J Biol Chem* 2000, **275**(39):30046-30049.
211. Smyth LA, Collins I: **Measuring and interpreting the selectivity of protein kinase inhibitors.** *J Chem Biol* 2009, **2**(3):131-151.
212. Zhang X, Crespo A, Fernandez A: **Turning promiscuous kinase inhibitors into safer drugs.** *Trends Biotechnol* 2008, **26**(6):295-301.
213. Cherry M, Williams DH: **Recent kinase and kinase inhibitor X-ray structures: mechanisms of inhibition and selectivity insights.** *Curr Med Chem* 2004, **11**(6):663-673.
214. Scapin G: **Protein kinase inhibition: different approaches to selective inhibitor design.** *Curr Drug Targets* 2006, **7**(11):1443-1454.
215. Liu Y, Gray NS: **Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations.** *Nat Chem Biol* 2006, **2**(7):358-364.
216. Zhang J, Yang PL, Gray NS: **Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(1):28-39.
217. Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK, Zarrinkar PP: **Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**(11):1046-1051.
218. Blanc J, Geney R, Menet C: **Type II kinase inhibitors: an opportunity in cancer for rational design.** *Anticancer Agents Med Chem* 2013, **13**(5):731-747.
219. Noble ME, Endicott JA, Johnson LN: **Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure.** *Science* 2004, **303**(5665):1800-1805.
220. Bogoyevitch MA, Fairlie DP: **A new paradigm for protein kinase inhibition: blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding.** *Drug Discov Today* 2007, **12**(15-16):622-633.
221. Roskoski R, Jr.: **Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors.** *Pharmacol Res* 2019, **144**:19-50.

222. Takahashi H, Obata R, Tamaki Y: **A novel vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor, SU11248, suppresses choroidal neovascularization in vivo.** *J Ocul Pharmacol Ther* 2006, **22**(4):213-218.
223. Perez-Santonja JJ, Campos-Mollo E, Lledo-Riquelme M, Javaloy J, Alio JL: **Inhibition of corneal neovascularization by topical bevacizumab (Anti-VEGF) and Sunitinib (Anti-VEGF and Anti-PDGF) in an animal model.** *Am J Ophthalmol* 2010, **150**(4):519-528 e511.
224. Perez-Santonja JJ, Campos-Mollo E, Lledo-Riquelme M, Fernandez-Sanchez L, Cuenca-Navarro N: **[Vascular morphological and microdensity changes of corneal neovascularization induced by topical bevacizumab and sunitinib in an animal model].** *Arch Soc Esp Oftalmol* 2013, **88**(12):473-481.
225. Ko BY, Kim YS, Baek SG, Lee GW, Kim JM, Jean WS, Lee NS, Kang J: **Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival and topical bevacizumab and sunitinib in a rabbit model.** *Cornea* 2013, **32**(5):689-695.
226. Park YH, Roh SY, Lee YC: **Effect of sorafenib on experimental choroidal neovascularization in the rat.** *Clin Exp Ophthalmol* 2010, **38**(7):718-726.
227. Seo JW, Chung SH, Choi JS, Joo CK: **Inhibition of corneal neovascularization in rats by systemic administration of sorafenib.** *Cornea* 2012, **31**(8):907-912.
228. Kernt M, Staehler M, Stief C, Kampik A, Neubauer AS: **Resolution of macular oedema in occult choroidal neovascularization under oral Sorafenib treatment.** *Acta Ophthalmol* 2008, **86**(4):456-458.
229. Kami J, Muranaka K, Yanagi Y, Obata R, Tamaki Y, Shibuya M: **Inhibition of choroidal neovascularization by blocking vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase.** *Jpn J Ophthalmol* 2008, **52**(2):91-98.
230. Honda M, Asai T, Umemoto T, Araki Y, Oku N, Tanaka M: **Suppression of choroidal neovascularization by intravitreal injection of liposomal SU5416.** *Arch Ophthalmol* 2011, **129**(3):317-321.
231. Keskin U, Totan Y, Karadag R, Erdurmus M, Aydin B: **Inhibitory effects of SU5416, a selective vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, on experimental corneal neovascularization.** *Ophthalmic Res* 2012, **47**(1):13-18.
232. Maier P, Unsoeld AS, Junker B, Martin G, Dreves J, Hansen LL, Agostini HT: **Intravitreal injection of specific receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222 584 improves ischemia-induced retinopathy in mice.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005, **243**(6):593-600.
233. Hos D, Bock F, Dietrich T, Onderka J, Kruse FE, Thierauch KH, Cursiefen C: **Inflammatory corneal (lymph)angiogenesis is blocked by VEGFR-tyrosine**

- kinase inhibitor ZK 261991, resulting in improved graft survival after corneal transplantation.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, **49**(5):1836-1842.
234. Chaoran Z, Zhirong L, Gezhi X: **Combination of vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor inhibition markedly improves the antiangiogenic efficacy for advanced stage mouse corneal neovascularization.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011, **249**(10):1493-1501.
235. Yafai Y, Yang XM, Niemeyer M, Nishiwaki A, Lange J, Wiedemann P, King AG, Yasukawa T, Eichler W: **Anti-angiogenic effects of the receptor tyrosine kinase inhibitor, pazopanib, on choroidal neovascularization in rats.** *Eur J Pharmacol* 2011, **666**(1-3):12-18.
236. Iwase T, Oveson BC, Hashida N, Lima e Silva R, Shen J, Krauss AH, Gale DC, Adamson P, Campochiaro PA: **Topical pazopanib blocks VEGF-induced vascular leakage and neovascularization in the mouse retina but is ineffective in the rabbit.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, **54**(1):503-511.
237. Thakur A, Scheinman RI, Rao VR, Kompella UB: **Pazopanib, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor, reduces diabetic retinal vascular leukostasis and leakage.** *Microvasc Res* 2011, **82**(3):346-350.
238. Amparo F, Sadrai Z, Jin Y, Alfonso-Bartolozzi B, Wang H, Shikari H, Ciolino JB, Chodosh J, Jurkunas U, Schaumberg DA *et al*: **Safety and efficacy of the multitargeted receptor kinase inhibitor pazopanib in the treatment of corneal neovascularization.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, **54**(1):537-544.
239. Danis R, McLaughlin MM, Tolentino M, Staurengi G, Ye L, Xu CF, Kim RY, Johnson MW, Pazopanib Eye Drops Study G: **Pazopanib eye drops: a randomised trial in neovascular age-related macular degeneration.** *Br J Ophthalmol* 2014, **98**(2):172-178.
240. Singh R, Wurzelmann JI, Ye L, Henderson L, Hossain M, Trivedi T, Kelly DS: **Clinical evaluation of pazopanib eye drops in healthy subjects and in subjects with neovascular age-related macular degeneration.** *Retina* 2014, **34**(9):1787-1795.
241. Csaky KG, Dugel PU, Pierce AJ, Fries MA, Kelly DS, Danis RP, Wurzelmann JI, Xu CF, Hossain M, Trivedi T: **Clinical evaluation of pazopanib eye drops versus ranibizumab intravitreal injections in subjects with neovascular age-related macular degeneration.** *Ophthalmology* 2015, **122**(3):579-588.
242. Velez G, Weingarden AR, Lei H, Kazlauskas A, Gao G: **SU9518 inhibits proliferative vitreoretinopathy in fibroblast and genetically modified Muller cell-induced rabbit models.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, **54**(2):1392-1397.

243. Kernt M, Thiele S, Liegl RG, Kernt B, Eibl K, Haritoglou C, Ulbig MW, Kampik A: **Axitinib modulates hypoxia-induced blood-retina barrier permeability and expression of growth factors.** *Growth Factors* 2012, **30**(1):49-61.
244. Kang S, Roh CR, Cho WK, Park KC, Yang KJ, Choi HS, Kim SH, Roh YJ: **Antiangiogenic effects of axitinib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on laser-induced choroidal neovascularization in mice.** *Curr Eye Res* 2013, **38**(1):119-127.
245. Giddabasappa A, Lalwani K, Norberg R, Gukasyan HJ, Paterson D, Schachar RA, Rittenhouse K, Klamerus K, Mosyak L, Eswaraka J: **Axitinib inhibits retinal and choroidal neovascularization in in vitro and in vivo models.** *Exp Eye Res* 2016, **145**:373-379.
246. Onder HI, Erdurmus M, Bucak YY, Simavli H, Oktay M, Kukner AS: **Inhibitory effects of regorafenib, a multiple tyrosine kinase inhibitor, on corneal neovascularization.** *Int J Ophthalmol* 2014, **7**(2):220-225.
247. Rho CR, Kang S, Park KC, Yang KJ, Choi H, Cho WK: **Antiangiogenic effects of topically administered multiple kinase inhibitor, motesanib (AMG 706), on experimental choroidal neovascularization in mice.** *J Ocul Pharmacol Ther* 2015, **31**(1):25-31.
248. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO: **Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization.** *Cornea* 1998, **17**(6):611-613.
249. Shibuya M: **Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis.** *BMB Rep* 2008, **41**(4):278-286.
250. Jo N, Mailhos C, Ju M, Cheung E, Bradley J, Nishijima K, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT: **Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization.** *Am J Pathol* 2006, **168**(6):2036-2053.
251. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G, Cursiefen C: **Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007, **48**(6):2545-2552.
252. Kim TI, Kim SW, Kim S, Kim T, Kim EK: **Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin).** *Cornea* 2008, **27**(3):349-352.
253. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T *et al*: **PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of**

- vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 2000, **60**(8):2178-2189.
254. Gross-Goupil M, Francois L, Quivy A, Ravaud A: **Axitinib: a review of its safety and efficacy in the treatment of adults with advanced renal cell carcinoma.** *Clin Med Insights Oncol* 2013, **7**:269-277.
255. Furrer P, Mayer JM, Plazonnet B, Gurny R: **Ocular tolerance of absorption enhancers in ophthalmic preparations.** *AAPS PharmSci* 2002, **4**(1):E2.
256. Hu-Lowe DD, Zou HY, Grazzini ML, Hallin ME, Wickman GR, Amundson K, Chen JH, Rewolinski DA, Yamazaki S, Wu EY *et al*: **Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(22):7272-7283.
257. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB *et al*: **In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(1):327-337.
258. Kumar R, Knick VB, Rudolph SK, Johnson JH, Crosby RM, Crouthamel MC, Hopper TM, Miller CG, Harrington LE, Onori JA *et al*: **Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(7):2012-2021.
259. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M *et al*: **BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.** *Cancer Res* 2004, **64**(19):7099-7109.
260. Escudier B, Gore M: **Axitinib for the management of metastatic renal cell carcinoma.** *Drugs R D* 2011, **11**(2):113-126.
261. Campos-Mollo E, Perez-Santonja JJ, Lledo-Riquelme M, Ortega Pastor E, Alio JL: **New corneal neovascularization model in rabbits for angiogenesis research.** *Ophthalmic Res* 2011, **45**(3):135-141.
262. Chang JH, Garg NK, Lunde E, Han KY, Jain S, Azar DT: **Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review.** *Surv Ophthalmol* 2012, **57**(5):415-429.

263. Qazi Y, Maddula S, Ambati BK: **Mediators of ocular angiogenesis**. *J Genet* 2009, **88**(4):495-515.
264. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP: **Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization**. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, **39**(1):18-22.
265. Krizova D, Vokrojova M, Liehneova K, Studeny P: **Treatment of Corneal Neovascularization Using Anti-VEGF Bevacizumab**. *J Ophthalmol* 2014, **2014**:178132.
266. Acar BT, Halili E, Acar S: **The effect of different doses of subconjunctival bevacizumab injection on corneal neovascularization**. *Int Ophthalmol* 2013, **33**(5):507-513.
267. Lichtinger A, Yeung SN, Kim P, Amiran MD, Elbaz U, Slomovic AR: **Corneal endothelial safety following subconjunctival and intrastromal injection of bevacizumab for corneal neovascularization**. *Int Ophthalmol* 2014, **34**(3):597-601.
268. Turkcu FM, Cinar Y, Turkcu G, Sahin A, Cingu AK, Yuksel H, Sahin M, Yildirim A, Caca I: **Topical and subconjunctival ranibizumab (lucentis) for corneal neovascularization in experimental rat model**. *Cutan Ocul Toxicol* 2014, **33**(2):138-144.
269. Doukas J, Mahesh S, Umeda N, Kachi S, Akiyama H, Yokoi K, Cao J, Chen Z, Dellamary L, Tam B *et al*: **Topical administration of a multi-targeted kinase inhibitor suppresses choroidal neovascularization and retinal edema**. *J Cell Physiol* 2008, **216**(1):29-37.
270. Darland DC, D'Amore PA: **Cell-cell interactions in vascular development**. *Curr Top Dev Biol* 2001, **52**:107-149.
271. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P: **Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms**. *FASEB J* 2004, **18**(2):338-340.
272. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D: **Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors**. *J Clin Invest* 2003, **111**(9):1287-1295.
273. Gauler TC, Besse B, Mauguen A, Meric JB, Gounant V, Fischer B, Overbeck TR, Krissel H, Laurent D, Tiainen M *et al*: **Phase II trial of PTK787/ZK 222584 (vatalanib) administered orally once-daily or in two divided daily doses as second-line monotherapy in relapsed or progressing patients with stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer (NSCLC)**. *Ann Oncol* 2012, **23**(3):678-687.

-
274. Los M, Roodhart JM, Voest EE: **Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer.** *Oncologist* 2007, **12**(4):443-450.
275. Kelly RJ, Rixe O: **Axitinib (AG-013736).** *Recent Results Cancer Res* 2010, **184**:33-44.
276. Lu L, Saha D, Martuza RL, Rabkin SD, Wakimoto H: **Single agent efficacy of the VEGFR kinase inhibitor axitinib in preclinical models of glioblastoma.** *J Neurooncol* 2015, **121**(1):91-100.
277. Rixe O, Bukowski RM, Michaelson MD, Wilding G, Hudes GR, Bolte O, Motzer RJ, Bycott P, Liau KF, Freddo J *et al*: **Axitinib treatment in patients with cytokine-refractory metastatic renal-cell cancer: a phase II study.** *Lancet Oncol* 2007, **8**(11):975-984.
278. Gunnarsson O, Pfanzelter NR, Cohen RB, Keefe SM: **Evaluating the safety and efficacy of axitinib in the treatment of advanced renal cell carcinoma.** *Cancer Manag Res* 2015, **7**:65-73.
279. Cohen EE, Rosen LS, Vokes EE, Kies MS, Forastiere AA, Worden FP, Kane MA, Sherman E, Kim S, Bycott P *et al*: **Axitinib is an active treatment for all histologic subtypes of advanced thyroid cancer: results from a phase II study.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(29):4708-4713.
280. Schiller JH, Larson T, Ou SH, Limentani S, Sandler A, Vokes E, Kim S, Liau K, Bycott P, Olszanski AJ *et al*: **Efficacy and safety of axitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: results from a phase II study.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(23):3836-3841.
281. Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK: **Experimental corneal neovascularization: biomicroscopic, angiographic, and morphologic correlation.** *Cornea* 1985, **4**(1):35-41.
282. Zakrzewicz A, Secomb TW, Pries AR: **Angioadaptation: keeping the vascular system in shape.** *News Physiol Sci* 2002, **17**:197-201.
283. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L: **VEGF-receptor signal transduction.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**(9):488-494.
284. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M: **Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(16):9349-9354.
285. Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M: **Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis.** *Cancer Res* 2001, **61**(3):1207-1213.
-

286. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H *et al*: **Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions.** *Nat Med* 2001, **7**(5):575-583.
287. Yamazaki Y, Morita T: **Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors.** *Mol Divers* 2006, **10**(4):515-527.
288. Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F: **Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions.** *Oncologist* 2006, **11**(7):753-764.
289. Kevil CG, Okayama N, Trocha SD, Kalogeris TJ, Coe LL, Specian RD, Davis CP, Alexander JS: **Expression of zonula occludens and adherens junctional proteins in human venous and arterial endothelial cells: role of occludin in endothelial solute barriers.** *Microcirculation* 1998, **5**(2-3):197-210.
290. Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, King AG, Levin R, Campochiaro PA: **Suppression and regression of choroidal neovascularization by the multitargeted kinase inhibitor pazopanib.** *Arch Ophthalmol* 2009, **127**(4):494-499.
291. Bock F, Konig Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C: **Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008, **246**(2):281-284.
292. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC, Chevez-Barrios P: **Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin).** *Br J Ophthalmol* 2007, **91**(6):804-807.
293. Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan F, Bucana CD, McMahon G, Gallick GE, Ellis LM: **Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival.** *FASEB J* 2001, **15**(7):1239-1241.
294. Bergers G, Song S: **The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.** *Neuro Oncol* 2005, **7**(4):452-464.
295. Murphy HS, Ward PA: **Inflamación.** In: *Patología estructural Fundamentos clinicopatológicos en medicina.* edn. Edited by Rubin E, F. G, Rubin R, Schwarting R, Strayer D. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España; 2005: 38-77.
296. Cursiefen C, Masli S, Ng TF, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, Streilein JW: **Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, **45**(4):1117-1124.

-
297. Bock F, Onderka J, Rummelt C, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Schlotzer-Schrehardt U, Cursiefen C: **Safety profile of topical VEGF neutralization at the cornea.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009, **50**(5):2095-2102.
298. Jenkins TL, Aderman CM, Ho AC: **Reversible Retinal Toxicity in a Patient Taking Axitinib.** *Retin Cases Brief Rep* 2018.
299. Shi S, Peng F, Zheng Q, Zeng L, Chen H, Li X, Huang J: **Micelle-solubilized axitinib for ocular administration in anti-neovascularization.** *Int J Pharm* 2019, **560**:19-26.
300. Myles ME, Neumann DM, Hill JM: **Recent progress in ocular drug delivery for posterior segment disease: emphasis on transscleral iontophoresis.** *Adv Drug Deliv Rev* 2005, **57**(14):2063-2079.
301. Ranta VP, Urtti A: **Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling.** *Adv Drug Deliv Rev* 2006, **58**(11):1164-1181.
302. Gamache DA, Graff G, Brady MT, Spellman JM, Yanni JM: **Nepafenac, a unique nonsteroidal prodrug with potential utility in the treatment of trauma-induced ocular inflammation: I. Assessment of anti-inflammatory efficacy.** *Inflammation* 2000, **24**(4):357-370.
303. Anshu A, Price MO, Price FW, Jr.: **Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty.** *Ophthalmology* 2012, **119**(3):536-540.
304. Riss S, Heindl LM, Bachmann BO, Kruse FE, Cursiefen C: **Pentacam-based big bubble deep anterior lamellar keratoplasty in patients with keratoconus.** *Cornea* 2012, **31**(6):627-632.
305. Williams KA, Coster DJ: **The immunobiology of corneal transplantation.** *Transplantation* 2007, **84**(7):806-813.
306. Niederkorn JY, Larkin DF: **Immune privilege of corneal allografts.** *Ocul Immunol Inflamm* 2010, **18**(3):162-171.
307. Kuchle M, Cursiefen C, Nguyen NX, Langenbucher A, Seitz B, Wenkel H, Martus P, Naumann GO: **Risk factors for corneal allograft rejection: intermediate results of a prospective normal-risk keratoplasty study.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002, **240**(7):580-584.
308. Cursiefen C, Martus P, Nguyen NX, Langenbucher A, Seitz B, Kuchle M: **Corneal neovascularization after nonmechanical versus mechanical corneal trephination for non-high-risk keratoplasty.** *Cornea* 2002, **21**(7):648-652.
309. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, Goren MB, Rapuano CJ, Laibson PR, Cohen EJ: **Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty.** *Cornea* 1995, **14**(6):604-609.
-

310. Cursiefen C, Cao J, Chen L, Liu Y, Maruyama K, Jackson D, Kruse FE, Wiegand SJ, Dana MR, Streilein JW: **Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, **45**(8):2666-2673.
311. Bachmann BO, Luetjen-Drecoll E, Bock F, Wiegand SJ, Hos D, Dana R, Kruse FE, Cursiefen C: **Transient postoperative vascular endothelial growth factor (VEGF)-neutralisation improves graft survival in corneas with partly regressed inflammatory neovascularisation.** *Br J Ophthalmol* 2009, **93**(8):1075-1080.
312. Dietrich T, Bock F, Yuen D, Hos D, Bachmann BO, Zahn G, Wiegand S, Chen L, Cursiefen C: **Cutting edge: lymphatic vessels, not blood vessels, primarily mediate immune rejections after transplantation.** *J Immunol* 2010, **184**(2):535-539.
313. Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, Taylor AW, Dana MR: **Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts.** *J Exp Med* 2002, **195**(2):259-268.
314. Cursiefen C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, Sorokin L, Breiteneder-Geleff S, Alitalo K, Jackson D: **Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, **43**(7):2127-2135.
315. Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, Van Rooijen N, Takenaka H, D'Amore PA, Stein-Streilein J *et al*: **Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages.** *J Clin Invest* 2005, **115**(9):2363-2372.
316. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, D'Amore PA, Dana MR, Wiegand SJ, Streilein JW: **VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment.** *J Clin Invest* 2004, **113**(7):1040-1050.
317. Fukumoto A, Maruyama K, Walsh T, Kajiya K, Hamuro J, D'Amore PA, Kinoshita S: **Intracellular thiol redox status regulates lymphangiogenesis and dictates corneal limbal graft survival.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, **51**(5):2450-2458.
318. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV: **Lymphangiogenesis in development and human disease.** *Nature* 2005, **438**(7070):946-953.
319. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Pytowski B, Cursiefen C: **Blockade of VEGFR3-signalling specifically inhibits lymphangiogenesis in**

- inflammatory corneal neovascularisation.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008, **246**(1):115-119.
320. Steven P, Muller M, Koop N, Rose C, Huttmann G: **Comparison of Cornea Module and Dermalinspect for noninvasive imaging of ocular surface pathologies.** *J Biomed Opt* 2009, **14**(6):064040.
321. Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P: **The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update.** *Biochem J* 2007, **408**(3):297-315.
322. Robbie SJ, Lundh von Leithner P, Ju M, Lange CA, King AG, Adamson P, Lee D, Sychterz C, Coffey P, Ng YS *et al*: **Assessing a novel depot delivery strategy for noninvasive administration of VEGF/PDGF RTK inhibitors for ocular neovascular disease.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, **54**(2):1490-1500.
323. Janoria KG, Gunda S, Boddu SH, Mitra AK: **Novel approaches to retinal drug delivery.** *Expert Opin Drug Deliv* 2007, **4**(4):371-388.
324. Ambati J, Canakis CS, Miller JW, Gragoudas ES, Edwards A, Weissgold DJ, Kim I, Delori FC, Adamis AP: **Diffusion of high molecular weight compounds through sclera.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**(5):1181-1185.



8.

ANEXO: COMUNICACIONES DE INVESTIGACIÓN Y PUBLICACIONES

8.1. PREMIO

PREMIO DRES. GALO Y GUSTAVO LEOZ

A LA MEJOR COMUNICACIÓN DE INVESTIGACIÓN

"Inhibición de la neovascularización corneal con axitinib tópico, un inhibidor de la tirosina quinasa multidiaria"

Pérez Santonja JJ, Campos-Mollo E, Lledó Riquelme M, Fernández-Sánchez L.

Otorgado por la Sociedad Española de Oftalmología en Oviedo, a 28 de Septiembre de 2012

8.2. COMUNICACIONES DE INVESTIGACIÓN

- Campos Mollo E, Pérez Santonja JJ, **Lledó Riquelme M**. Nuevo modelo de neovascularización en animal de experimentación para la investigación de la angiogénesis. 85 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Santander, del 23 al 27 de Septiembre de 2009.
- Campos Mollo E, Pérez Santonja JJ, **Lledó Riquelme M**, Fernández Sánchez L. Inhibition of corneal neovascularization with topical tyrosine kinase inhibitors. XXVIII Congress of European Society of Cataract and Refractive Surgery. Paris, 4-8 September 2010.
- Pérez Santonja JJ, Campos Mollo E, **Lledó Riquelme M**, Fernández Sánchez L. Inhibición de la neovascularización corneal con axitinib tópico, un inhibidor de la tirosina quinasa multidiaria. 88 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Barcelona, del 26 al 29 de Septiembre de 2012.

- **Lledó Riquelme M**, Campos Mollo E, Pérez santonja JJ. Axitinib tópico (0,5mg/mL) produce una inhibición profunda de la angiogénesis corneal en un modelo experimental. 91 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología celebrado en Sevilla del 23 al 26 de Septiembre de 2015.

8.3. COMUNICACIONES EN VÍDEO

- **Lledó Riquelme M**, Campos Mollo E. Acciones biológicas y moleculares de los inhibidores de los receptores tirosina quinasa en la angiogénesis corneal. 94 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología celebrado en Granada del 26 al 29 de Septiembre de 2018.

8.4. PUBLICACIONES AUTORREFERENCIADAS

- Pérez Santonja JJ, Campos Mollo E, **Lledó Riquelme M**, Javaloy J, Alió J. Inhibition of corneal neovascularization by topical bevacizumab (anti-VEGF) and sunitinib (anti-VEGF and anti-PDGF) in an animal model. Am J Ophthalmol 2010; 150:519-528.
- Campos Mollo E, Pérez Santonja, **Lledó Riquelme M**, Ortega Pastor E, Alió J. New corneal neovascularization model in rabbits for angiogenesis research. Ophthalmic Res 2010; 45:135-141.
- Pérez Santonja JJ, Campos Mollo E, **Lledó Riquelme M**, Cuenca Navarro N. Cambios en la morfología y la microdensidad neovascular corneal inducidos tras la administración tópica de bevacizumab y sunitinib en un modelo animal. Arch Soc Esp Oftalmol 2013;88:413-471.

8.5. ARTÍCULO ORIGINAL

Manuscript number: doi: 10.1111/ceo.13333

Journal: CLÍNICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY

Category of manuscript: Original Article- Laboratory Science.

Title: Topical axitinib is a potent inhibitor of corneal neovascularization.

Keywords: Axitinib, Tyrosine kinase inhibitor, Corneal neovascularization, Cornea, angiogenesis

Complete List of Authors (Order of Authors)

Lledó Riquelme, Mariola (MD)

Campos-Mollo, Ezequiel (PhD)

Fernández-Sánchez, Laura (PhD)

Addresses of the institutions

Hospital Virgen de los Lirios; Department of Ophthalmology

University of Alicante, Department of Physiology, Genetics and Microbiology

Miguel Hernandez University, Pathology and Surgery Department, Ophthalmology area

Corresponding author:

María Dolores Lledó Riquelme

C/ Gonzalo Barrachina nº 12-1º A

C. P. 03801 Alcoy (Alicante)

Email address: mariola.lledo@hotmail.com

Telephone number: 678171576

Short running title: Axitinib for corneal neovascularization

Declaration of competing/conflicts of interest and a declaration of funding sources:

- Publication of this article was supported in part by a research grant from the Institute of Health Carlos III (PS09/02407), Madrid, Spain.
- The authors have no financial conflicts of interest.

ABSTRACT

Background: This study evaluated the effects of topically applied axitinib, a tyrosine kinase inhibitor, in an experimental model of corneal neovascularization (CNV).

Methods: A total of 48 New Zealand rabbits were used. CNV was induced by placing five silk sutures in the upper cornea of one eye per rabbit. Rabbits were randomized into four groups (12 rabbits each): 0.9% saline (control group), 0.02 mg/mL axitinib, 0.35 mg/mL axitinib and 0.5 mg/mL axitinib groups. All treatments were administered three times daily for 14 days. Photographs were taken using a slit lamp on days 7 and 14. The area of neovascularization was measured in mm², as the percentage of total corneal area and as the percentage of corneal surface covered by sutures (SCS).

Results: On day 14, the CNV area in the control group (31.50 \pm 7.47 mm²; 115.00 \pm 22.55% of the corneal SCS) was larger than that in the 0.02 mg/mL axitinib group (19.20 \pm 8.92 mm²; 73.89 \pm 34.98%), the 0.35 mg/mL axitinib group (8.83 \pm 3.92 mm²; 31.90 \pm 13.59%) and the 0.5 mg/mL axitinib group (5.12 \pm 3.97 mm²; 18.38 \pm 13.65%). Compared with saline, CNV was inhibited 39.04% by 0.02 mg/mL axitinib, 71.96% by 0.35 mg/mL axitinib and 84.73% by 0.5 mg/mL axitinib.

Conclusion: Topical administration of the three axitinib concentrations inhibited CNV in rabbits, blocking both vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor pathways. Axitinib at 0.5 mg/mL induced profound inhibition of corneal angiogenesis.

KEY WORD: angiogenesis, axitinib, cornea, corneal neovascularization, tyrosine kinase inhibitor.

INTRODUCTION

Corneal neovascularization (CNV) is a common consequence of several inflammatory, infectious and traumatic corneal diseases.¹ In addition, neovascularization introduces

circulating immune cells, reducing the immune privilege of the cornea and subsequently compromising the survival of corneal transplant grafts.²

VEGF is commonly considered the most prominent angiogenic factor. Among members of the VEGF family, VEGF-A is considered the major factor involved in hemangiogenesis, receiving the greatest attention as a mediator of pathologic neovascularization. VEGF-A and its tyrosine kinase receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) are involved in many aspects of the angiogenic process: vascular permeability, survival, migration and proliferation of endothelial cells and capillary tube formation.^{3,4} On the other hand, VEGF-C and VEGF-D bind to the VEGFR-3 receptor with a strong capacity to induce lymphangiogenesis.⁵

Vascular endothelial cells produce PDGF-B and surrounding mural cells, such as pericytes and vascular smooth muscle cells, express its receptor (PDGFR- β). PDGF induces the recruitment of pericytes and allows the maturation of neoformed vessels.⁶ Therefore, combined inhibition of the signalling pathway of both VEGF and PDGF could be more effective than only inhibition of the VEGF system for the treatment of CNV.⁷

Conventional CNV therapy is based on the administration of corticosteroids. However, corticosteroids are not always effective and can induce long-term side effects including the development of cataracts, glaucoma and increased risk of infection.² The most commonly used anti-VEGF for off-label treatment of CNV is bevacizumab, a recombinant monoclonal antibody that directly acts against VEGF-A isoforms. However, experimental and clinical studies have shown that bevacizumab only partially reduces CNV.⁷⁻¹¹

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are small molecules that can inhibit the cascade of intracellular signal transduction stimulated by one or more tyrosine kinase receptors.¹² These molecules have been well established as clinically useful drugs for the treatment of cancer.

Axitinib is a potent synthetic molecule that stabilizes the kinase domain in an inactive conformation (TKI type II), blocking VEGF transduction signal.¹³ To the best of our knowledge, no work has yet to evaluate the antiangiogenic effects of topically administrated axitinib on corneal neovascularization. Thus, the purpose of the present study was to investigate the antiangiogenic capacity of topically administrated axitinib in a rabbit suture-induced CNV model.

MATERIAL AND METHODS

Axitinib (AG-013736)

Axitinib is a potent small TKI derived from indazole (mw 386.47 Da) that has been demonstrated to be advantageous in a wide variety of tumours including melanomas, colorectal carcinomas, and tumours of the pancreas, thyroid, breast, and lung.¹⁴⁻¹⁶ At picomolar concentrations, it is a potent and highly selective inhibitor of VEGF tyrosine kinase receptors (VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3). At nanomolar concentrations, it also inhibits the platelet-derived growth factor receptors α and β (PDGF- α and β)

Three topical concentrations of axitinib were selected based on the following rationale: a) **0.02 mg/ml axitinib**: an axitinib concentration comparable to previous studies of 5 mg/ml bevacizumab to obtain comparable results. As a reference, we considered the *in vitro* results of the inhibition of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation induced by human VEGF₁₆₅ acting on VEGFR-2. Drug concentrations for topical use were obtained from the product of its $IC_{50} \times 222,222$ because the used concentration of 5 mg/ml bevacizumab is approximately 222,222 times its IC_{50} ; b) **0.35 mg/ml axitinib**: an axitinib concentration comparable to 0.5 mg/ml sunitinib, as used in our previous studies.^{7,17} This concentration was calculated by considering the molecular weight of the drug to employ the same number of moles; and c) **0.5 mg/ml axitinib**: an equivalent dose to that used in previous studies of other TKIs, including sunitinib^{7,17} and pazopanib.¹⁸⁻²⁰

Axitinib was prepared from the active ingredient provided by LC laboratories (free base axitinib, LC Laboratories, Woburn, MA, USA) and dissolved in saline to the desired concentration.

Experimental model and study groups

A total of 48 New Zealand rabbits weighing 2.5 to 3 kg were randomly assigned to 4 groups (12 rabbits per group) corresponding to each of the selected drugs: Group 1 (control group) saline; group 2: axitinib 0.02 mg/ml; group 3: axitinib 0.35 mg/ml; and group 4: axitinib 0.5 mg/ml.

A corneal neovascularization model was induced in the right eye of each rabbit with a triangular pattern based on the placement of five 8/0 interrupted blue virgin silk sutures (LorcaMarin SA, Murcia, Spain) at midstromal depth in the upper cornea following a limbal-based triangular pattern²¹ (Figure 1 a).

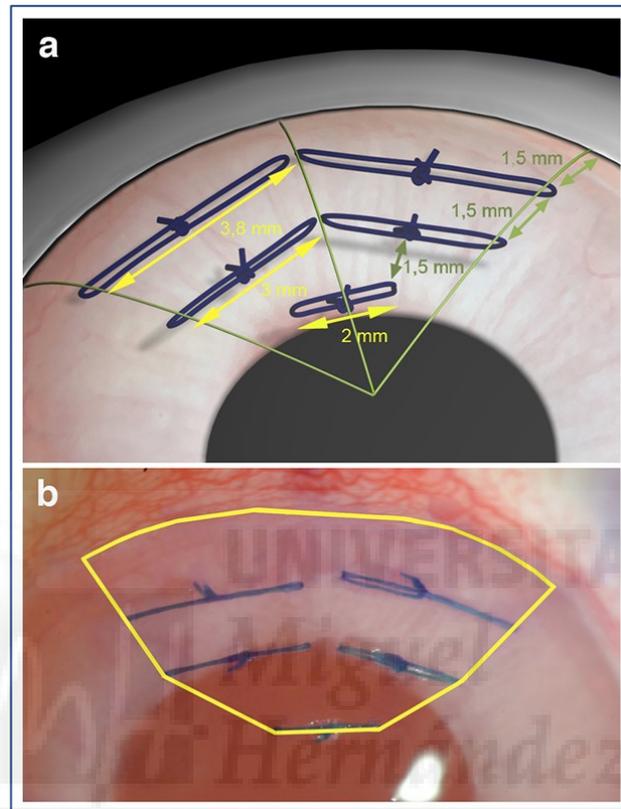


Figure 1. a) Suture technique used to induce corneal neovascularization in rabbits; b) measurement of the stimulus area represented by the surface covered by sutures (SCS) using image processing software.

Beginning the following day, 2 drops of the selected agent were topically administered three times a day (every 8 hours) for two weeks.

Under anaesthesia, slit-lamp photographic control was performed to quantify the angiogenic stimulus surface (surface covered by sutures, SCS) on day 3 and the corneal neovascularization surface (CNVS) on day 14.

The rabbits were sacrificed after two weeks, and the corneas were processed by enzymatic staining to analyse the vascular microdensity. Eight eyes were designated to analyse vascular morphology, and four eyes, for the anatomopathological study.

The measurement and quantification of all experimental procedures were performed by an examiner blinded to all treatment groups. All procedures and experimentation with the animals were performed according to the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) standards for animal handling.

Measurement of the surface covered by sutures (SCS) and quantification of CNV surface (CNVS)

Two calibrated colour photographs of each cornea were taken to measure the corneal SCS on day 3 of follow-up (Figure 1 b). The corneal photographs were captured at a magnification of $\times 10$ using a FinePix S2Pro digital camera (Fuji Photo Film Corporation Limited, Tokyo, Japan) attached to a slit-lamp (SL-D7, Topcon Corporation, Tokyo, Japan). Image-Pro Plus V.6.0 software (Media Cybernetics Incorporated, Bethesda, Maryland, USA) designed for image processing and analysis was employed.

On day 14, rabbit corneas were also evaluated by slit-lamp biomicroscopy to quantify the CNVS. Two colour and one red-free photographs were calibrated using a graduated ruler with a resolution of 0.5 mm. The mean value from all 3 photographs was used.

Vascular microdensity and anatomopathological studies

Eight eyes from each group were allocated for assessments of vascular morphology and vascular microdensity. The corneas were sectioned to obtain a block of triangular tissue containing the area covered by the sutures and, therefore, the CNVS. The blocks of corneal tissue were processed by enzymatic staining using the NADPH diaphorase technique.

As shown in Figure 2, two areas were analysed. Zone one was located between the limbus and the first row of suture points, and zone 2 was located between the first and second rows. Two points were selected for each zone: points were selected 750 μm from the limbus in zone one (sections A and B) and 2.250 μm from the limbus in zone 2 (sections C and D) at the centre of each suture.

In each zone, the corneal stroma area of both sections was measured and added to obtain the overall stromal area, as shown in Figure 3. All measurements were made using Image-Pro Plus software to calculate the vascular microdensity. (Figure 3).

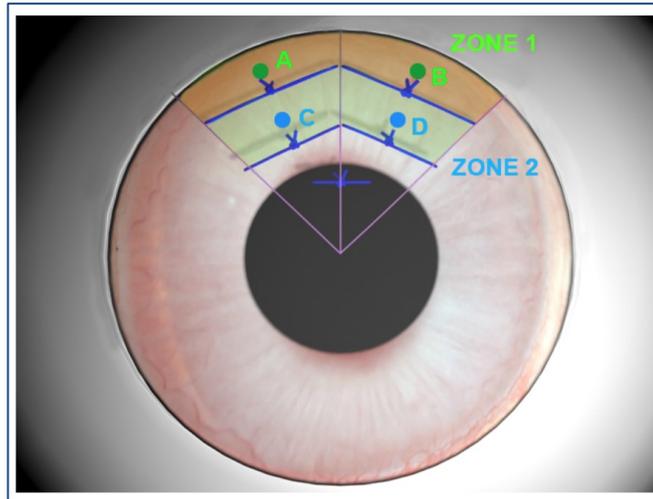


Figure 2. Schematic of the vascular microdensity study zones.

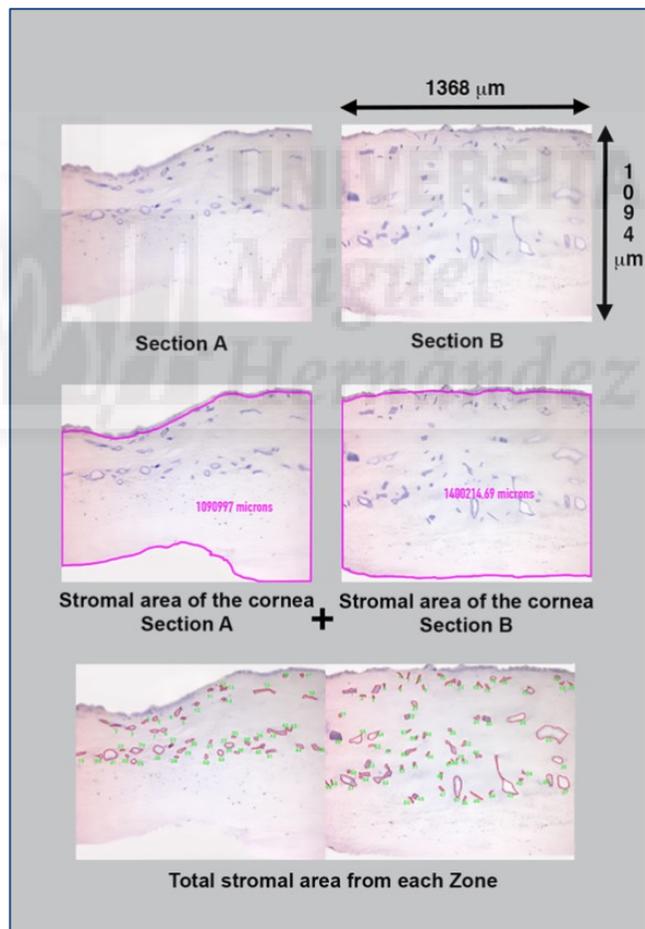


Figure 3. The corneal stroma area to be studied was calculated by adding the corneal stroma areas of the 2 sections of each zone. Based on the sum of the stromal areas, the vessels and vascular microdensity were analysed.

The diameter of a capillary is approximately 5 to 10 μm . Therefore, to avoid false positives, structures under 5 μm were excluded, as NADPH diaphorase technique can stain the nuclei of some cells that are likely involved in the inflammatory response, as well as individual nerve fibres of the sub-basal plexus whose diameters vary between 0.05 and 0.25 μm .

Four eyes from each group were allocated to the anatomopathological study. These eyes were stained using haematoxylin-eosin to evaluate the structural changes of the sutures, inflammatory infiltration, the distribution of corneal blood vessels in the corneal stroma, etc.

Statistical analysis

Parametric statistical tests were performed after verifying a normal distribution of the data by the one-sample Kolmogorov-Smirnov procedure. Differences were considered statistically significant when p values were less than 0.05.

RESULTS

Corneal neovascularization surface (CNVS)

CNVS data for each group are shown in Table 1, expressed in terms of square mm and the percentage of neovascularized area to corneal SCS.

TABLE 1. Corneal Neovascularization Surface After 14 Days of Treatment (Mean \pm SD)					
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	1-Way
	Saline	Axitinib 0.02 mg/ml	Axitinib 0.35 mg/ml	Axitinib 0.5 mg/ml	ANOVA
Square mm	31.50 \pm 7.47	19.20 \pm 8.92	8.83 \pm 3.92	5.12 \pm 3.97	P < .001
Percentage of neovascularized area to corneal area covered by sutures	115.00 \pm 22.55	73.89 \pm 34.98	31.90 \pm 13.59	18.38 \pm 13.75	P < .001
Inhibition rate	0%	39.04%	71.96%	83.74%	

ANOVA = analysis of variance; SD = Standard deviation.

CNVSs measured on the calibrated photographs are shown in Figure 4.

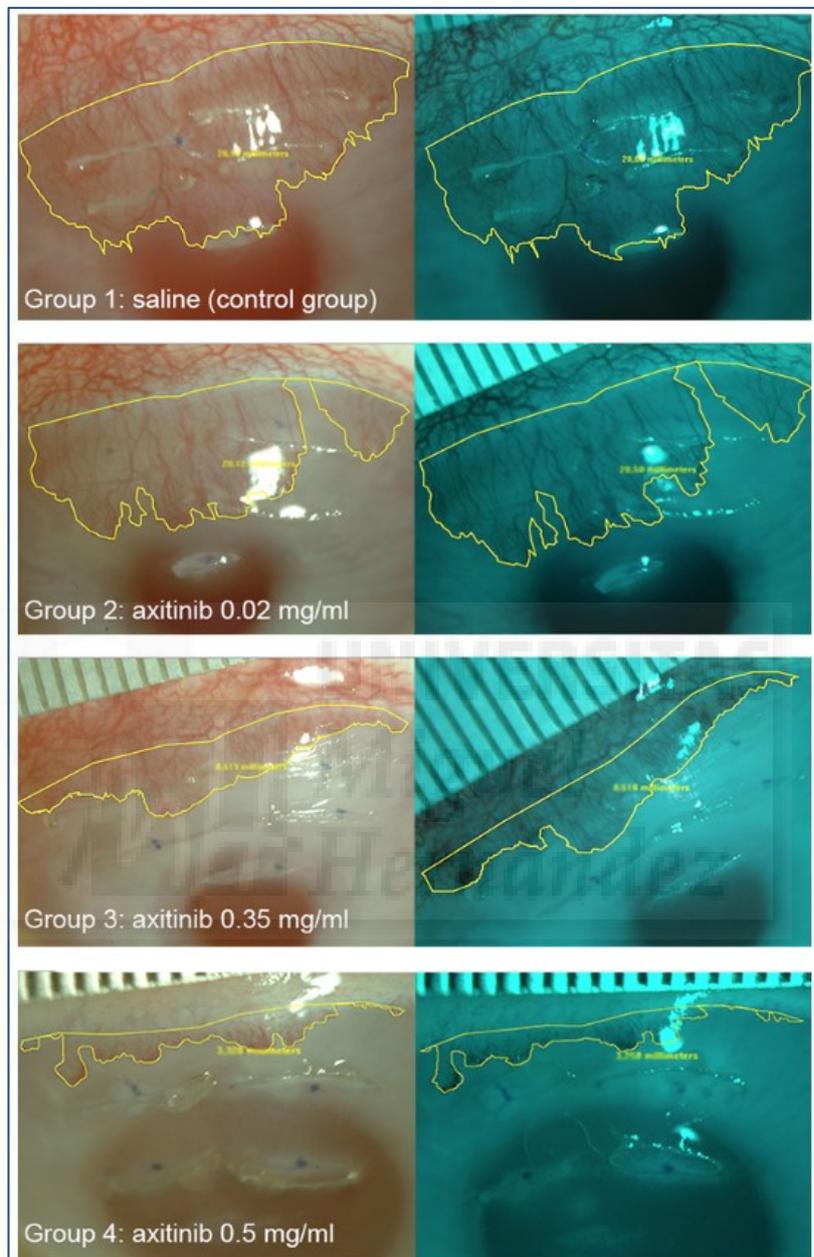


Figure 4. Colour and red-free photographs of rabbit corneas showing the corneal neovascularization area (yellow line) after 14 days of treatment in all experimental groups.

On day 14, group 1 (saline) presented a CNVS of $31.50 \pm 7.47 \text{ mm}^2$, constituting $115.00 \pm 22.55\%$ of the SCS. This result demonstrated that the area of the corneal surface covered with neovascular vessels increased with time in group 1, and fourteen days were sufficient for the new blood vessels to cover all of the stimulating area (SCS). In group 2

(axitinib 0.02 mg/ml), the CNVS was $19.20 \pm 8.92 \text{ mm}^2$, corresponding to $73.89 \pm 34.98\%$ of the SCS, and group 3 showed a CNVS of $8.83 \pm 3.92 \text{ mm}^2$, representing $31.90 \pm 13.59\%$ of the SCS. In group 4, the CNVS also increased during the follow-up period to $5.12 \pm 3.97 \text{ mm}^2$; however, only 18.38% of the stimulus area was covered by blood vessels on day 14 (Figure 5).

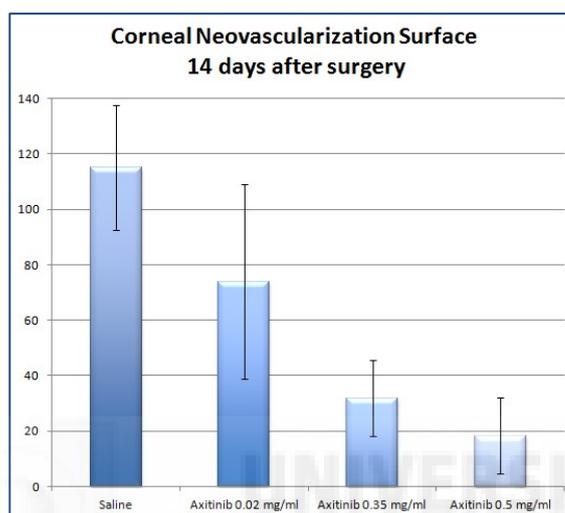


Figure 5. Corneal neovascularization surfaces by slit-lamp biomicroscopy 14 days after surgery (mean \pm SD) in terms of the percentage of the corneal surface covered by sutures (SCS).

At day 14, the CNVS measured in mm^2 in group 1 was higher than the CNVS in groups 2 (one-way ANOVA, $p = 0.009$), 3 ($p < 0.01$) and 4 ($p < 0.001$). The CNVS in group 2 was also significantly higher than the CNVS in group 3 ($p = 0.013$) and group 4 ($p = 0.01$). The CNVS in group 3 was higher than that in group 4, but the difference was not statistically significant ($p = 0.172$). At day 14, CNV was inhibited 39.04% by axitinib 0.02 mg/ml, 71.96% by axitinib 0.35 mg/ml and 83.74% by axitinib 0.5 mg/ml compared to CNV in the control group.

Vascular morphology

Before the section of the corneal samples, microscopy of corneal tissue stained with NADPH diaphorase showed that the emerging pericorneal arteries in group 1 (saline) were represented by branched projections oriented towards the sutures (angiogenic stimulus). As the vascular tree branched out, the uniform gauge of the arteries diminished towards the distal region, forming arterioles and capillaries. In the most distal areas of this vascular

plexus of small anastomosing channels were the immature vascular buds of the neovascularization front. The venous vessels from the venules were located in somewhat deeper planes, presenting a greater calibre and softer staining with respect to the arteries. The veins followed a more irregular and sinuous path into the pericorneal veins (Figure 6 a).

In the axitinib-treated groups, the response was in many cases limited to arborescent structures consisting of one or more branched vascular axes. The ramifications emitted by each vascular axis did not present a clear orientation towards the angiogenic stimulus, as in the control group. At the distal ends, the vessels exhibited characteristics of capillaries, with more anastomoses and small vascular sprouts (Figure 6 b and c).

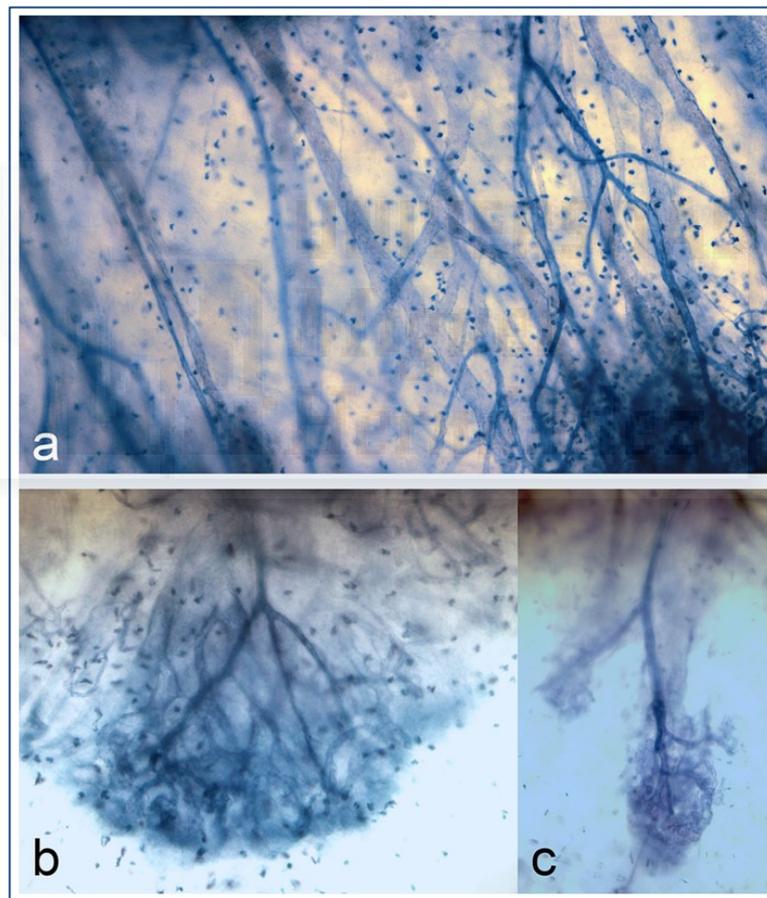


Figure 6. Microscopic photograph of the corneal neovascularization surface stained with NADPH diaphorase in an eye treated with saline. Arterial vessels exhibited darker staining, uniform gauge and straight pathways with some ramifications for angiogenic stimulation. Venous vessels were generally located in deeper planes with soft staining and greater sinuosity.

CNVS illustrations of the blood vessels of each group drawn using a camera lucida are shown in Figure 7.

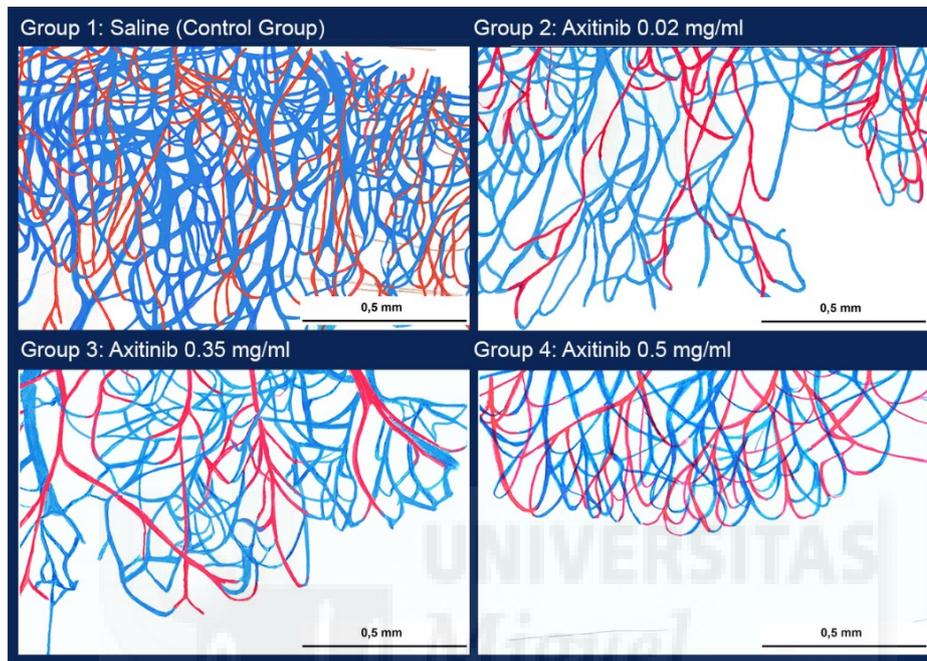


Figure 7. Corneal neovascularization surface illustrations. The blood vessels of each sample were drawn on DIN-A3 paper using a camera lucida included in an optical microscope (Leica Microsystems Limited Heerbrugg, Switzerland).

Microvascular density: number of vessels/mm² and percentage of vascular area

The number of vessels per mm² of sectioned corneal stroma represents the microvascular density. Comparing the values of the different groups, rabbits in the control group had a greater number of vessels/mm² than rabbits treated with axitinib in both zone 1 ($p < 0.016$) and zone 2 ($p < 0.019$). However, when comparing the means between the different groups treated with different concentrations of axitinib, no significant differences were observed ($p > 0.99$ in zone 1, $p > 0.08$ in zone 2). Therefore, axitinib reduces the number of vessels with respect to the saline treatment (Figure 8).

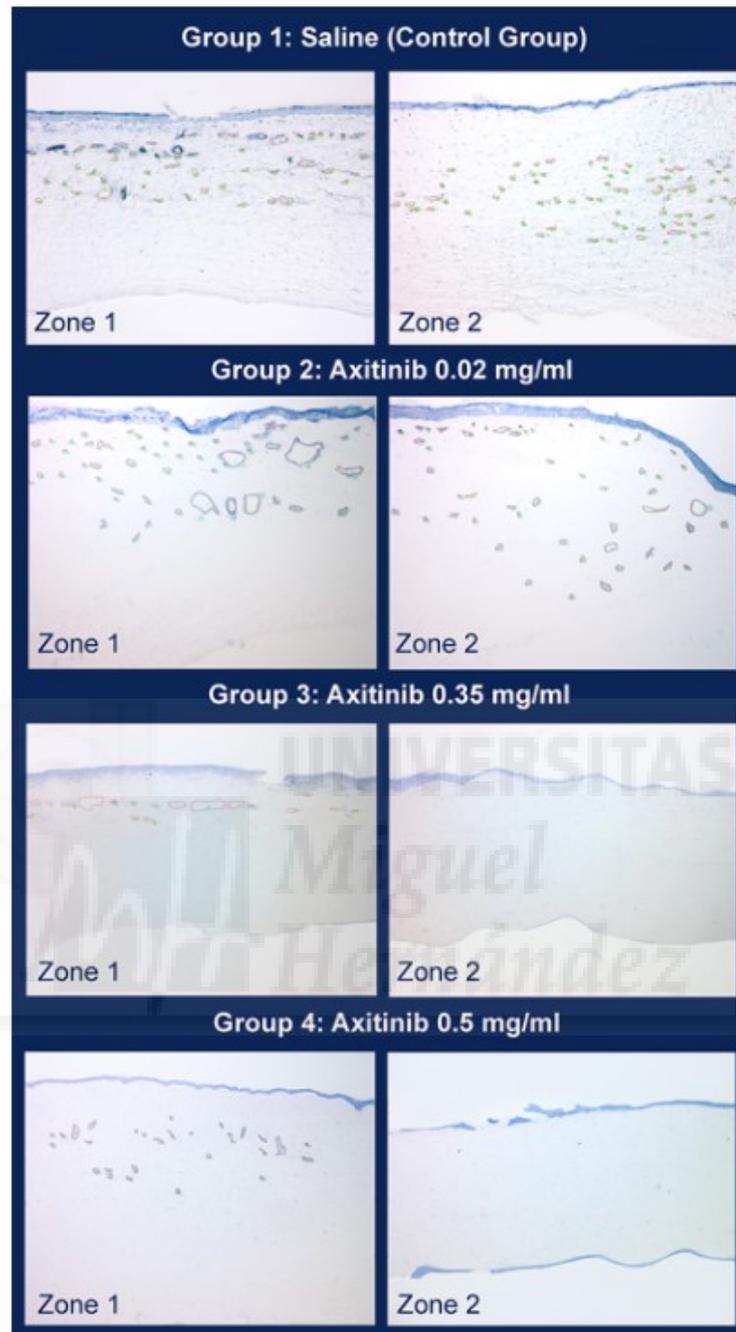


Figure 8. Corneal sections stained with NADPH diaphorase (100x) in zone 1 and zone 2 of each group.

The percentage of vascular area with respect to the sectioned corneal stroma area was calculated according to the following formula: (sum of the section of vessels/stromal area) \times 100. The percentage of vascular area was higher in rabbits of the control group than in rabbits treated with axitinib ($p < 0.001$ in zone 1 and $p < 0.03$ in zone 2). Comparing the

three groups treated with axitinib, there were significant differences only between group 2 (axitinib 0.02 mg/ml) and group 4 (0.5 mg/ml) in zone 2 ($p = 0.02$).

Interestingly, the percentage of vascular area did not exceed 5% with respect to the sectioned corneal stroma area in any rabbit of any group.

Figure 9 shows the average vessels/mm² and percentage of vascular area in zone 1 and zone 2.

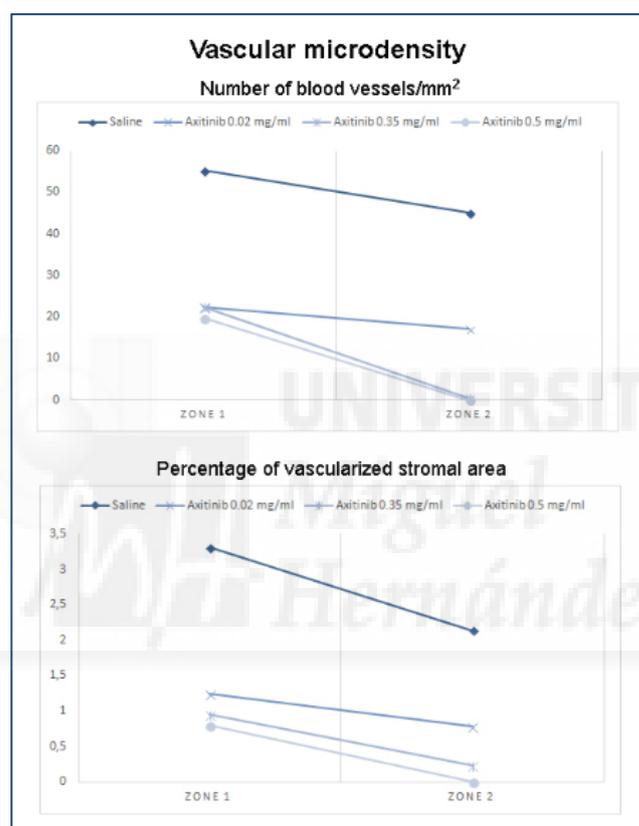


Figure 9. Variation between zone 1 (close to the limbus) and zone 2 (distal to the limbus) of the mean area of cut vessels, the number of vessels/mm² of stroma and the vascular microdensity in terms of stromal area percentage occupied by vessels.

Regarding the comparison of the vascular microdensity between zones 1 and 2 for each group, significant differences were observed in groups 3 and 4 (higher concentrations of axitinib) between zone 1 and 2. Therefore, we can conclude that, at these concentrations, axitinib inhibited angiogenesis more effectively, inducing a downward gradient in the vascular response with greater distances of the stimulus from the limbus.

Anatomopathological study

Granulomatous inflammation, in which lymphocytes and macrophages were predominant, was observed in the control group. Granulomatous inflammation occurred when macrophages accumulated substances that could not be digested (virgin silk) and transformed into epithelioid cells, constituting granulomas. Epithelioid cells contain an oval nucleus and a large central nucleolus and are organized to form cell masses with minimal space between cells (Figure 10 a).

Eyes treated with axitinib exhibited a reduced inflammatory reaction, fewer changes in the structure of the stroma in corneal sections with less tissue oedema and fewer blood vessels. In the proximal sutures, the inflammatory reaction manifested itself as smaller-sized and more delimited granulomas. However, at the distal sites, there was a minimal inflammatory reaction characterized by the absence of blood vessels (Figure 10 b).

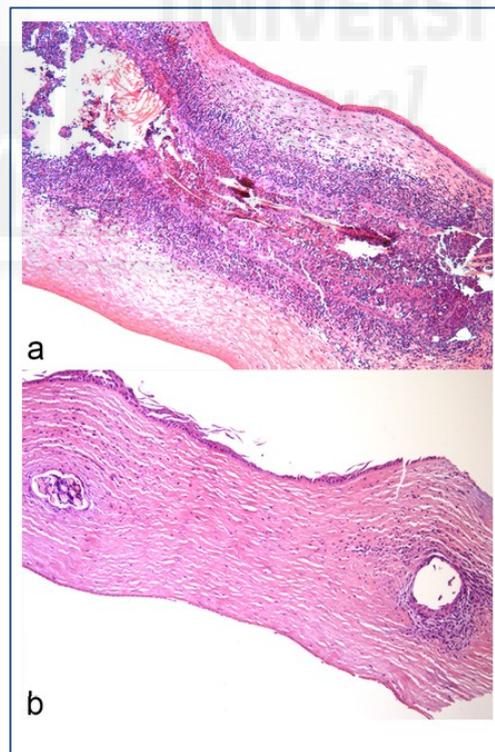


Figure 10 Histological section of rabbit cornea 14 days after surgery. (H & E \times 100): a) Intense inflammatory response in the control group (saline); b) minimal inflammatory reaction at a proximal point of a rabbit cornea treated with axitinib. A small granuloma was well delimited around the sutures.

Ocular side effects

The rabbits' eyes did not show signs of conjunctival hyperaemia, corneal ulcers, or iris or lens abnormalities in any of the groups during the study follow-up. In some rabbits of each group, a slight cellular reaction in the anterior chamber (5-10 cells/1x3 mm of beam) associated with the surgical procedure occurred, which was resolved in the following days without consequences. Examination of the fundus of the eye was also normal in all groups.

DISCUSSION

The activity of axitinib is related to the structure of the molecule and the spectrum of inhibition of the kinase. At low concentrations, axitinib appears to be considerably selective for VEGF receptors (VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3). The effects of axitinib result from its binding to the kinase domain of VEGF receptors, stabilizing it in an inactive conformation and, consequently, inhibiting VEGF transduction signal.¹⁶

Selective VEGF-A blockade, as with monoclonal antibodies, neutralizes the signal initiated by the growth factor. However, there is a range of VEGF subtypes, all of which play a role in signalling the three kinds of VEGF receptors. Because of the central role of VEGFR kinase activity, a small molecule such as axitinib that blocks VEGFR-1, -2 and -3 could provide a complete approach for blocking VEGF signalling, which would include inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis.

PDGF-B signalling, through PDGFR- β receptors, regulates the recruitment of mural cells into the growing vascular endothelial tube. Mural cells (pericytes and smooth muscle cells) are necessary for normal vessel function and stability. Endothelial vascular sprouts secrete PDGF-B, and by binding to PDGFR- β receptors expressed by pericytes, PDGF-B facilitates the proliferation, differentiation and migration of the same pericytes to stabilize new blood vessels.²²

In 2010, we published the results of an experimental rabbit cornea study comparing sunitinib (anti-VEGF and anti-PDGF) with bevacizumab (monoclonal anti-VEGF antibody). We demonstrated that sunitinib topically inhibits CNV by 82.3% and that topical administration of sunitinib was 3 times more effective than topical bevacizumab after 14 days of treatment.⁷ The findings suggested that simultaneous blockade of the VEGF and

PDGF systems is more effective in inhibiting CNV than only blockade of the VEGF system.⁷ This fact is of great relevance, since without the support of pericytes and VEGF signalling, apoptosis of the endothelial cell occurs.²³⁻²⁶

In a murine model of laser-induced choroidal neovascularization, Kang et al demonstrated that oral administration of axitinib results in regression of established neovascularization and suggested that axitinib may be a potent promoter of established choroidal neovascularization regression.²⁷

To our knowledge, it is the first study to show the antiangiogenic activity of topical axitinib in a model of ocular neovascularization in rabbits. After 14 days of topical treatment with axitinib at different concentrations (groups 2, 3 and 4), significant inhibition of CNVS was observed compared with the control group (group 1, saline). Axitinib at 0.02 mg/ml (group 2) inhibited the CNVS by 39.04%, and axitinib at 0.35 mg/ml (group 3) caused significant and intense inhibition by 71.96% of the CNVS. The inhibitory response induced by 0.5 mg/ml axitinib (group 4) was greater, inhibiting neovascularization by 83.74% with respect to the control group, although no significant differences in inhibition were found between groups 3 and 4. However, 0.35 mg/ml axitinib (group 3) and 0.5 mg/ml axitinib (group 4) were significantly more effective than group 2 (0.02 mg/ml) in terms of inhibition of CNVS.

Comparing the results of this study with those obtained in previous trials of sunitinib using the same methodology, 0.35 mg/ml axitinib and 0.5 mg/ml axitinib did not induce significant differences in the inhibition of CNVS compared with 0.5 mg/ml sunitinib (data not shown).^{7,17}

It is unclear whether other inhibitory activities of axitinib contribute to its high level of efficacy, although there is some evidence that a simultaneous blockade of PDGF and VEGF-A could be superior to blockade of either alone. In this regard, agents that inhibit multiple angiogenic pathways would be more desirable for improving therapeutic approaches.

In a pathological clinical study in corneal buttons, Cursiefen and coauthors observed that more than 80% of vessels were covered by pericytes at two weeks after the onset of CNV.²⁸ Therefore, combined treatment against endothelial cells and pericytes is necessary to enhance treatment against new blood vessels in an advanced stage of maturation. Pericytes, recruited by the vessels through the action of PDGF, join with the vessel during formation, thus stabilizing it. In this state, endothelial cells become less dependent on VEGF.

In addition to the paracrine process, cell-cell contact enhances the survival of vascular endothelial cells.^{29,30} Thus, in an advanced stage of maturation, the vessels are restrictive towards anti-VEGF therapy. Attenuation of pericytes caused by PDGF blockade may potentiate the antiangiogenic effect of VEGF receptor inhibitors.³¹ Therefore, more attention should be paid to pericytes and their interactions with endothelial cells to better understand the full potential of antiangiogenic therapy.

In relation to the vascular microdensity, a reduction in the number of vessels and in the percentage of the vascular area with respect to the stroma was observed in the groups treated with axitinib compared to the control group. Among the different concentrations of axitinib, a significant difference was only found between the concentrations of 0.02 mg/ml axitinib and 0.5 mg/ml axitinib, with 0.02 mg/ml axitinib inducing a significantly lower effect.

According to the morphological findings of the vascular tree in the groups treated with axitinib (groups 2-4), the vascular axes consisted of a small-calibre central artery with short branches without a definite orientation, suggest that the molecular and biological processes associated with the VEGF and/or PDGF system could be relevant in the remodelling of neoformed vessels.

Compared with the control group, histological corneal sections of the axitinib groups generally showed lower inflammation with delimited granulomas around the proximal sutures with a more homogeneous and localized distribution of lymphoplasmacytic infiltrate, epithelial cells, and macrophages. In the distal sutures of the high-concentration axitinib groups, almost no inflammatory reaction was observed. These characteristics of the immune response could be explained by potent inhibition of blood and lymphatic vessels, allowing access of inflammatory cells to the sutures only by diffusion through the stroma from preexisting limbic vessels and marginal blood vessels. In fact, TKIs, by blocking VEGF receptors, reduce the recruitment of lymphatic precursor cells and antigen-presenting cells (APCs) and suppress the proliferation of vascular endothelial cells.³²

The safety of topical axitinib for the treatment of CNV was also determined in this study by evaluating ocular and systemic adverse effects. At the different doses studied topical axitinib was well tolerated after 14 days of treatment, and no adverse effects were observed on ocular structures.

The adverse effects profile of axitinib that occurs with continuous systemic administration appears to be comparable with the adverse effect profile that occurs for administration of systemic anti-VEGF medications. The most common of the adverse effects produced

by systemic axitinib is fatigue caused by hypothyroidism.¹⁵ Other related effects are hypertension, anorexia, hoarseness and nausea.³³ However, adverse effects are generally well managed with dose modification and supportive treatment.^{14,15,33} In treatments to suppress VEGF for neovascular diseases of the eye, the following factors must be considered. In the cornea, VEGF appears to have a neurotrophic effect. Thus, caution should also be taken when applying anti-VEGF treatments in the presence of epithelial defects or in situations where healing of a corneal wound occurs.³⁴ On the other hand, in a murine model with a PDGF-B deficiency, the presence of focal vascular retinopathy accompanied by a loss of mural cells (pericytes) of the vessels has been described, and such mice develop a pathology similar to diabetic retinopathy.^{23,35}

In previous experimental studies of sunitinib in rabbits, yellowish staining was observed in the iris of the eyes of all rabbits, which disappeared within a few days after discontinuation of treatment. This staining was caused by deposition of sunitinib on the surface of the iris because the agent in suspension has a golden-yellow colour. The deposition of sunitinib on the surface of the iris was largely relevant, because the yellow colour functioned as a tracer indicating that the molecule was able to reach the anterior chamber after topical application. This finding could be of great clinical utility for the treatment of intraocular neovascular diseases.^{7,36}

However, it is true that, in clinical practice, an undesired side effects must be considered, especially for prolonged or chronic treatments. In our study, we did not observe any adverse side effects with axitinib treatment because it is white, and after dilution with saline serum, becomes colourless.

Conclusions

In summary, a novel, topically administered, tyrosine kinase receptor inhibitor, axitinib, significantly and extensively inhibited corneal neovascularization in rabbit eyes. The high capacity of axitinib to block neovascularization in the cornea could be a consequence of its multitargeting activity, inhibiting both VEGF and PDGF. In addition, by blocking VEGFR-3, axitinib could inhibit corneal lymphangiogenesis and was able to promote the survival of corneal grafts after corneal transplant.

Axitinib, at the doses and duration used in the study, is safe and well tolerated. However, further studies are needed to define the possible side effects and toxicity of this drug when used in the eye for an extended period of time. Additional studies are needed to determine its mechanisms of action, optimal doses, and side effects. In this context, it is

mandatory to carry out randomized controlled clinical trials to establish the effectiveness and safety of the treatment regimens of axitinib for future applications as a therapeutic alternative for treating ocular neovascular pathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank JJ Pérez Santonja for providing insight and expertise in the early stages of the research. We thank our colleague JJ Alió for assistance and comments that greatly improved the manuscript. We would also like to express our gratitude to Nicolás Cuenca for his comments and experience in the histological study.

REFERENCES

1. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17: 611-3.
2. Maddula S, Davis DK, Maddula S, Burrow MK, Ambati BK. Horizons in therapy for corneal angiogenesis. *Ophthalmology* 2011; 118: 591-9.
3. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 242-9.
4. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; 104: 264-302.
5. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 2008; 41: 278-86.
6. Jo N, Mailhos C, Ju M, Cheung E, Bradley J, Nishijima K, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol* 2006; 168: 2036-53.
7. Perez-Santonja JJ, Campos-Mollo E, Lledo-Riquelme M, Javaloy J, Alio JL. Inhibition of corneal neovascularization by topical bevacizumab (Anti-VEGF) and Sunitinib (Anti-VEGF and Anti-PDGF) in an animal model. *Am J Ophthalmol* 2010; 150: 519-28 e1.
8. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G, Cursiefen C. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2545-52.
9. Kim TI, Kim SW, Kim S, Kim T, Kim EK. Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin). *Cornea* 2008; 27: 349-52.
10. Dastjerdi MH, Al-Arfaj KM, Nallasamy N, Hamrah P, Jurkunas UV, Pineda R, 2nd, Pavan-Langston D, Dana R. Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study. *Arch Ophthalmol* 2009; 127: 381-9.
11. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, Rootman D, Slomovic A. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization. *Cornea* 2008; 27: 142-7.
12. Smyth LA, Collins I. Measuring and interpreting the selectivity of protein kinase inhibitors. *J Chem Biol* 2009; 2: 131-51.

13. Gross-Goupil M, Francois L, Quivy A, Ravaud A. Axitinib: a review of its safety and efficacy in the treatment of adults with advanced renal cell carcinoma. *Clin Med Insights Oncol* 2013; 7: 269-77.
14. Cohen EE, Rosen LS, Vokes EE, Kies MS, Forastiere AA, Worden FP, Kane MA, Sherman E, Kim S, Bycott P, Tortorici M, Shalinsky DR, Liao KF, Cohen RB. Axitinib is an active treatment for all histologic subtypes of advanced thyroid cancer: results from a phase II study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4708-13.
15. Schiller JH, Larson T, Ou SH, Limentani S, Sandler A, Vokes E, Kim S, Liao K, Bycott P, Olszanski AJ, von Pawel J. Efficacy and safety of axitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: results from a phase II study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3836-41.
16. Kelly RJ, Rixe O. Axitinib (AG-013736). *Recent Results Cancer Res* 2010; 184: 33-44.
17. Perez-Santonja JJ, Campos-Mollo E, Lledo-Riquelme M, Fernandez-Sanchez L, Cuenca-Navarro N. [Vascular morphological and microdensity changes of corneal neovascularization induced by topical bevacizumab and sunitinib in an animal model]. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2013; 88: 473-81.
18. Csaky KG, Dugel PU, Pierce AJ, Fries MA, Kelly DS, Danis RP, Wurzelmann JI, Xu CF, Hossain M, Trivedi T. Clinical evaluation of pazopanib eye drops versus ranibizumab intravitreal injections in subjects with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2015; 122: 579-88.
19. Danis R, McLaughlin MM, Tolentino M, Staurengi G, Ye L, Xu CF, Kim RY, Johnson MW, Pazopanib Eye Drops Study Group. Pazopanib eye drops: a randomised trial in neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2014; 98: 172-8.
20. Amparo F, Sadrai Z, Jin Y, Alfonso-Bartolozzi B, Wang H, Shikari H, Ciolino JB, Chodosh J, Jurkunas U, Schaumberg DA, Dana R. Safety and efficacy of the multitargeted receptor kinase inhibitor pazopanib in the treatment of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54: 537-44.
21. Campos-Mollo E, Perez-Santonja JJ, Lledo-Riquelme M, Ortega Pastor E, Alio JL. New corneal neovascularization model in rabbits for angiogenesis research. *Ophthalmic Res* 2011; 45: 135-41.
22. Darland DC, D'Amore PA. Cell-cell interactions in vascular development. *Curr Top Dev Biol* 2001; 52: 107-49.
23. Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S, Abramsson A, Enge M, Hellstrom M, Backstrom G, Fredriksson S, Landegren U, Nystrom HC, Bergstrom G, Dejana E, Ostman A, Lindahl P, Betsholtz C. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev* 2003; 17: 1835-40.
24. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9: 685-93.
25. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* 2004; 18: 338-40.
26. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003; 111: 1287-95.
27. Kang S, Roh CR, Cho WK, Park KC, Yang KJ, Choi HS, Kim SH, Roh YJ. Antiangiogenic effects of axitinib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Curr Eye Res* 2013; 38: 119-27.
28. Cursiefen C, Hofmann-Rummelt C, Kuchle M, Schlotzer-Schrehardt U. Pericyte recruitment in human corneal angiogenesis: an ultrastructural study with clinicopathological correlation. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 101-6.
29. Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan F, Bucana CD, McMahon G, Gallick GE, Ellis LM. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *FASEB J* 2001; 15: 1239-41.
30. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005; 7: 452-64.

31. Chaoran Z, Zhirong L, Gezhi X. Combination of vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor inhibition markedly improves the antiangiogenic efficacy for advanced stage mouse corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011; 249: 1493-501.
32. Hos D, Bock F, Dietrich T, Onderka J, Kruse FE, Thierauch KH, Cursiefen C. Inflammatory corneal (lymph)angiogenesis is blocked by VEGFR-tyrosine kinase inhibitor ZK 261991, resulting in improved graft survival after corneal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 1836-42.
33. Rixe O, Bukowski RM, Michaelson MD, Wilding G, Hudes GR, Bolte O, Motzer RJ, Bycott P, Liau KF, Freddo J, Trask PC, Kim S, Rini BI. Axitinib treatment in patients with cytokine-refractory metastatic renal-cell cancer: a phase II study. *Lancet Oncol* 2007; 8: 975-84.
34. Cursiefen C, Masli S, Ng TF, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, Streilein JW. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1117-24.
35. Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N, Hammes HP, Shani M, Fassler R, Betsholtz C. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J* 2002; 21: 4307-16.
36. Ko BY, Kim YS, Baek SG, Lee GW, Kim JM, Jean WS, Lee NS, Kang J. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival and topical bevacizumab and sunitinib in a rabbit model. *Cornea* 2013; 32: 689-95.



AGRADECIMIENTOS

Por su amplia implicación en la realización de mi Tesis Doctoral me gustaría dar las gracias a los miembros de mi equipo de investigación:

A mi maestro, el Dr. Ezequiel Campos, mi fuente inspiración y mi caja de resonancia, quien durante el todo el desarrollo de la esta línea de investigación, se ha encargado de supervisar y realizar un seguimiento continuo de la presente Tesis, velando por su calidad y contribuyendo en la difusión de los resultados. Sus ilustraciones han enriquecido el manuscrito y es quien ha fomentado mi iniciativa con el fin de poder alcanzar plena autonomía como investigadora.

Al Profesor Alió, por su amplio y profundo conocimiento de la ciencia de la visión, es una continua inspiración para cualquier oftalmólogo que tenga la esperanza de dejar su huella en la vida académica.

Al Profesor Nicolás Cuenca que siempre me ha proporcionado un estímulo significativo y buenos consejos durante toda la investigación. Me ha ayudado en la comprensión y aptitud técnica para el estudio histológico de las córneas.

A Jesús Oliver, Esther Román y mi hermano Salvador por su ayuda y apoyo moral durante todo este arduo viaje.

También quiero expresar mi gratitud a mis compañeros del Departamento de Biología de la Universidad de Alicante y del Hospital, en especial a Laura Hernández, Gemma Esquivá y Laura Campello que me han prestado su colaboración para poder llevar a término este proyecto.

