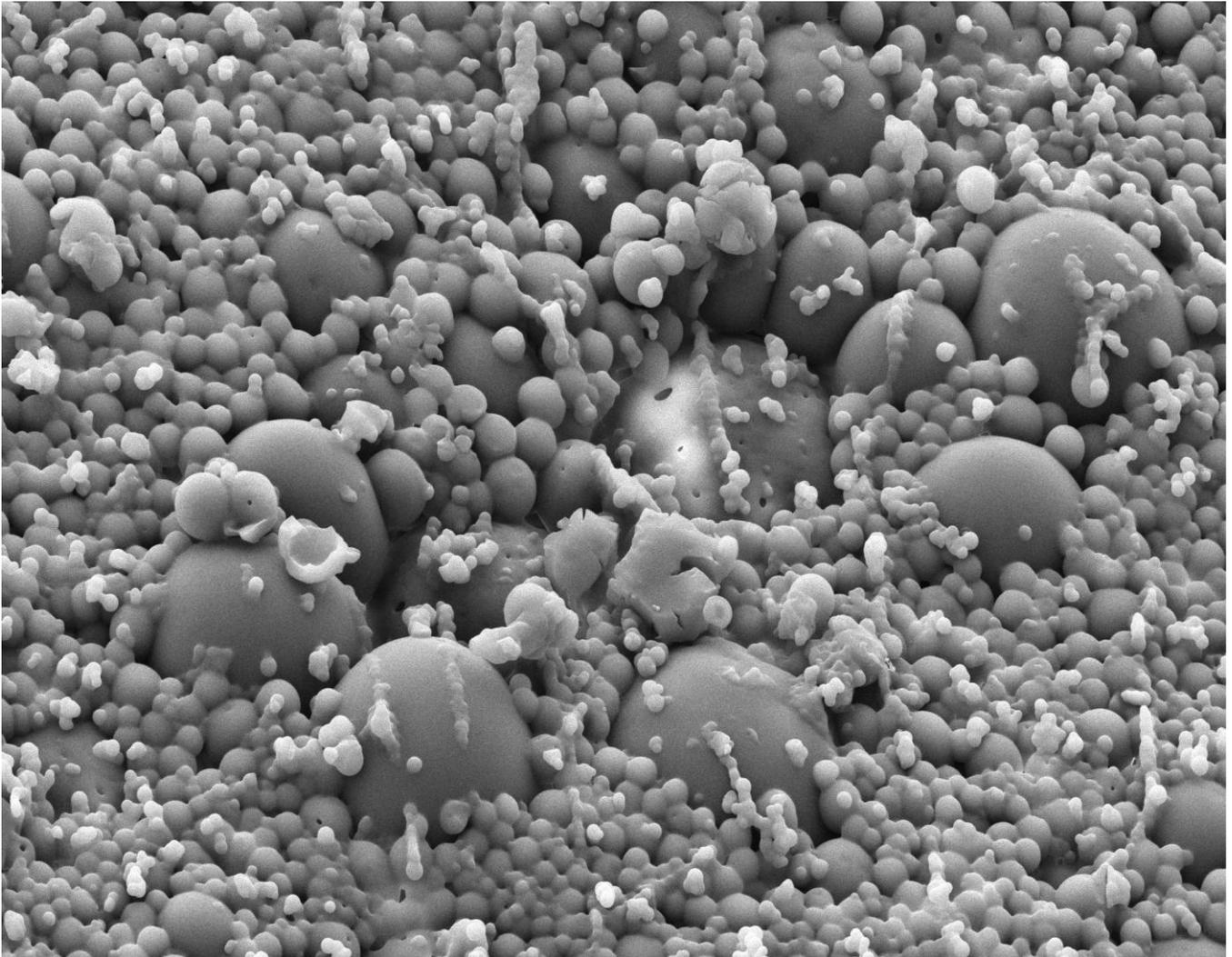


Leioa, 2012



ESTUDIO DE LA
TRABECULECTOMÍA
EXPERIMENTAL MEDIANTE
IMPLANTE DE PLGA COMO
DISPOSITIVO DE LIBERACIÓN
CONTROLADA DE FÁRMACOS



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



Esta obra está bajo una licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)
[Unported](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

TESIS DOCTORAL | IÑAKI RODRÍGUEZ AGIRRETXE

Trabajo de investigación financiado por el Ministerio de
Ciencia e Innovación (PPT-010000-2009-30)

A Arantxa, Borja e Iñigo

AGRADECIMIENTOS

La ayuda que, de una manera u otra, me han brindado diversas personas a lo largo de los años, ha culminado en este trabajo. Mi agradecimiento a todas ellas es lógico y obligado.

Jamás podré olvidar el esfuerzo y apoyo de mis padres, Ana y José Antonio, que me ha permitido la formación necesaria para dedicarme a la oftalmología. Me considero un afortunado por haber podido elegir mi destino profesional.

Mi formación científica ha tenido claros referentes que no debían de faltar a esta cita. En Juan Durán descubrí la inquietud científica, condición necesaria para cualquier investigador. En Javier Mendicute, el rigor y la búsqueda de la excelencia. Su generoso esfuerzo en mi malograda "primera Tesis" ha sido uno de los tres motores de la ilusión por realizar este trabajo. El segundo motor ha sido Elena Vecino, que me permitió extender al laboratorio mi actividad clínica en el glaucoma. En ella encontré el estímulo y la inmunidad al desaliento que tantas veces se adueña de aquel que emprende un trabajo de estas características. Para el tercer motor reservo mi último párrafo.

Esta Tesis no hubiera sido posible sin Tatiana Suárez y Jon Careaga. De ellos nació la ilusión de crear la empresa Bioftalmik, a la que debo el mecenazgo de este trabajo. No puedo olvidar la ayuda *in vitro* de Sandra Vega. Sus grandes dosis de dedicación y paciencia con un "analfabeto farmacológico" han permitido la formulación de esta Tesis.

Agradezco a Agurtzane Rivas su buen talante y dedicación, así como a María Hernández y al personal del Estabulario de la UPV. Tampoco olvidaré la aportación de Miguel Alonso, la diligencia en la búsqueda bibliográfica del personal de la Biblioteca del Hospital Donostia, así como la ayuda estadística de Cristina Sarasqueta.

Estoy en deuda también con Ricardo Rezola quien, de forma desinteresada, me abrió las puertas del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Oncológico, ayudándome en el análisis histológico.

Sería injusto si no mencionara aquí los ánimos recibidos de mi amigo José Ignacio Recalde (te confieso que no llegué a terminar el libro "How to write a thesis"), de Gonzalo Corcóstegui y de mis restantes compañeros del ICQO. Tampoco quiero olvidar las conversaciones sobre investigación con compañeros con los que comparto la forma de entender esta profesión, como Jaime Etxebarria, Ricardo Martínez, Haritz Urkola y Sergio Pinar.

Hablando de motores, Arantxa merece un apartado especial. A su papel como codirectora, psicóloga, informático y técnico de laboratorio de esta Tesis habría que añadir los que se derivan de una falta de ayuda doméstica que espero sepa perdonar. De ella es de quién más he aprendido y a quien dedico el mayor de mis agradecimientos.

Mi gratitud a todos

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. GENERALIDADES	3
2. DINÁMICA DEL ACUOSO	3
2.1. Presión intraocular	
2.2. Humor acuoso	
2.3. Eliminación del humor acuoso	
2.3.1. Eliminación trabecular	
2.3.1.1. Malla trabecular	
2.3.1.2. Canal de Schlemm	
2.3.1.3. Canales colectores	
2.3.2. Eliminación uveoescleral	
2.4. Dinámica del acuoso en el glaucoma	
2.4.1. Trabéculo	
2.4.2. Músculo ciliar	
3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL GLAUCOMA	8
3.1. Trabeculectomía	
3.2. Otras técnicas quirúrgicas	
3.2.1. Esclerectomía profunda no perforante	
3.2.2. Dispositivos de drenaje	
3.3. La ampolla filtrante	
3.3.1. Características histológicas	
3.3.2. Dinámica de filtración en la trabeculectomía	
4. MODULACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN TRAS TRABECULECTOMÍA	12
4.1. Proceso de cicatrización conjuntival	
4.2. Antiinflamatorios	
4.2.1. Corticoides	
4.2.2. Antiinflamatorios no esteroideos	
4.3. Antimitóticos	
4.3.1. 5-Fluorouracilo	
4.3.2. Mitomicina C	
4.3.3. Otros antimitóticos	
4.4. Otros tratamientos	
4.4.1. Radiación beta	
4.4.2. Inhibidores de factores de crecimiento	
4.4.2.1. Inhibidores del TGF β	
4.4.2.2. Inhibidores del CTGF	
4.4.2.3. Inhibidores del VEGF	
4.4.3. Terapia fotodinámica	
4.4.4. Inhibidores de las metaloproteasas	
4.4.5. Espaciadores y biomembranas	
5. DISPOSITIVOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS	29
5.1. Tipos de dispositivos	
5.2. Microencapsulación	
5.3. Microesferas	
5.4. Dispositivos de liberación en la cirugía filtrante	

- 5.4.1. Polianhídridos
- 5.4.2. Vinilos
- 5.4.3. Colágeno
- 5.4.4. Poliortoésteres
- 5.4.5. Polihidroxiésteres

OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES FARMACOLÓGICAS	43
1.1. 5-Fluorouracilo	
1.2. Mitomicina C	
1.3. Bevacizumab	
2. DETERMINACION <i>IN VITRO</i> DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS ANTIMITÓTICOS ..	44
2.1. Líneas celulares	
2.2. Ensayos de citotoxicidad de 5-Fluorouracilo y mitomicina C	
3. FORMULACIÓN DE MICROESFERAS E IMPLANTES DE PLGA	47
3.1. Producción de las microesferas	
3.2. Formulación de los implantes	
3.3. Radiación gamma	
3.4. Control microbiológico de los implantes	
4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS E IMPLANTES <i>IN VITRO</i>	50
4.1. Caracterización morfológica	
4.2. Estudio de la citotoxicidad de los implantes de mitomicina C	
4.3. Estudio de cinética de liberación de mitomicina C	
4.4. Eficiencia de encapsulación	
5. ANIMALES	54
6. TRABECULECTOMÍA EXPERIMENTAL	55
6.1. Anestesia	
6.2. Trabeculectomía	
7. EVALUACIÓN CLÍNICA	57
7.1. Fotografía del segmento anterior	
7.2. Medición de la presión intraocular	
7.3. Medición de las características de la ampolla filtrante	
8. EVALUACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA	60
9. GRUPOS DE ANIMALES	62
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63

1. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS ANTIMITÓTICOS.....	67
1.1. Dosis respuesta de 5-Fluorouracilo	
1.1.1. Línea celular SIRC	
1.1.2. Línea celular WKD	
1.2. Dosis respuesta de mitomicina C	
1.2.1. Línea celular SIRC	
1.2.2. Línea celular WKD	
1.3. Eficacia del citostático	
1.3.1. Eficacia de 5-Fluorouracilo y mitomicina C sobre la línea SIRC	
1.3.2. Eficacia de 5-Fluorouracilo y mitomicina C sobre la línea WKD	
1.4. Potencia del citostático	
1.4.1. Dosis letal 50 del 5-Fluorouracilo sobre las líneas SIRC y WKD	
1.4.2. Dosis letal 50 de la mitomicina C sobre las líneas SIRC y WKD	
1.5. Descripción microscópica de los cultivos celulares con mitomicina C	
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS <i>IN VITRO</i>.....	75
2.1. Microscopía óptica	
2.2. Microscopía electrónica de barrido	
2.3. Difractometría láser	
3. CARACTERIZACIÓN DE LOS IMPLANTES <i>IN VITRO</i>.....	76
3.1. Control microbiológico	
3.2. Caracterización morfológica	
3.3. Estudio de citotoxicidad	
3.4. Estudio de liberación de principio activo	
3.5. Eficiencia de encapsulación	
4. EVALUACIÓN CLÍNICA.....	85
4.1. Presión intraocular	
4.1.1. Evaluación del modelo experimental	
4.1.2. Evaluación de los tratamientos coadyuvantes	
4.1.3. Comparación entre tratamientos coadyuvantes	
4.2. Características de la ampolla filtrante	
4.2.1. Evaluación del modelo experimental	
4.2.2. Evaluación de los tratamientos coadyuvantes	
4.2.3. Comparación entre tratamientos coadyuvantes	
4.3. Estudio de correlación presión intraocular-ampolla filtrante	
4.4. Descripción de los grupos de estudio	
4.5. Complicaciones	
4.5.1. Complicaciones intraoperatorias	
4.5.2. Complicaciones postoperatorias	
5. EVALUACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA.....	119
5.1. Análisis de la trabeculectomía	
5.2. Análisis de la ampolla filtrante	
5.3. Características del implante	
5.3.1. Infiltrado celular	
5.3.2. Persistencia del implante	
5.3.3. Encapsulamiento del implante	

1. DISCUSIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VITRO*.....129

- 1.1. Estudios de citotoxicidad
- 1.2. Microesferas e implantes de PLGA
 - 1.2.1. Elección del material
 - 1.2.2. Formulación de microesferas e implantes
 - 1.2.3. Radiación gamma
 - 1.2.4. Caracterización de microesferas e implantes
 - 1.2.4.1. Caracterización morfológica
 - 1.2.4.2. Estudio de liberación del principio activo
 - 1.2.4.3. Eficiencia de encapsulación

2. DISCUSIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*.....136

- 2.1. Modelo experimental
 - 2.1.1. Animal de experimentación
 - 2.1.2. Inducción de glaucoma
 - 2.1.3. Anestesia
 - 2.1.4. Trabeculectomía
 - 2.1.5. Antimitóticos
 - 2.1.6. Evaluación clínica
 - 2.1.6.1. Medición de la presión intraocular
 - 2.1.6.2. Medición de la ampolla filtrante
 - 2.1.7. Análisis anatomopatológico
- 2.2. Evaluación del grupo control
- 2.3. Evaluación de los grupos de tratamiento
 - 2.3.1. Grupo mitomicina C tópica
 - 2.3.2. Grupo 5-Fluorouracilo tópico
 - 2.3.3. Grupo implante
 - 2.3.4. Grupo implante con mitomicina C recubierto por mitomicina C
 - 2.3.5. Grupo implante con mitomicina C recubierto por 5-Fluorouracilo
 - 2.3.6. Grupo bevacizumab subconjuntival
 - 2.3.7. Grupo implante con mitomicina C y bevacizumab subconjuntival

CONCLUSIONES **159**

BIBLIOGRAFÍA **163**

ANEXO **181**

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> . Análisis de varianza
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
ATP	Adenosin trifosfato
bFGF	<i>Fibroblast Growth Factor b</i> . Factor de crecimiento fibroblástico tipo b
BSS	<i>Balanced Salt Solution</i> . Solución salina balanceada
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i> . Factor de crecimiento del tejido conectivo
DL₅₀	Dosis letal 50
DNS	Diferencias no significativas
EC₅₀	Dosis efectiva 50
EE	Eficiencia de encapsulación
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> . Factor de crecimiento epidérmico
E_{max}	Efecto máximo
EPNP	Esclerectomía profunda no perforante
EUGS	<i>European Glaucoma Society</i>
EVA	<i>Ethylene Vinyl Acetate</i> . Acetato de etilenvinilo
FDA	Food and Drug Association
FFSS	<i>Fluorouracil Filtering Surgery Study</i> . Estudio de la cirugía filtrante con fluorouracilo
G	Gauge
GPAA	Glaucoma primario de ángulo abierto
GTP	Guanosin trifosfato
HCl	Ácido clorhídrico
IFNα	Interferón α
IGF-1	<i>Insulin Growth Factor 1</i> . Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL 1	Interleuquina 1
MAPK	<i>Mitogen Activated Tyrosine Kinase</i> . Proteín quinasa activada por mitógeno
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MMC	Mitomicina C
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i> . Metaloproteasas de matriz extracelular
ND	No definido
OCT	Optimal Cutting Temperature
OMS	Organización mundial de la salud
P	Nivel de significación estadístico
PCL	Policaprolactonas
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> . Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGA	<i>Polyglycolic acid</i> . Ácido poliglicólico
pH	Potencial de hidrógeno
PIO	Presión intraocular
PLA	<i>Polylactic acid</i> . Ácido poliláctico
PLGA	<i>Poly (lactic-co-glycolic) acid</i> . Ácido poliláctico-glicólico

POE	Poliortoésteres
PVA	<i>Polyvinyl alcohol</i> . Alcohol polivinílico
PVAc	<i>Polyvinyl Acetate</i> . Acetato de polivinilo
r	Coefficiente de correlación de Pearson
r²	Coefficiente de determinación
ROCK	<i>Rho associated protein Kinase</i> . Proteín quinasa dependiente de rho
r_s	Coefficiente de correlación de Spearman
S	Fase S (síntesis del DNA) del ciclo celular
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i> . Microscopio electrónico de barrido
SiARN	<i>Slow interference</i> ácido ribonucéico
SIRC	<i>Statens Seruminstitut Rabbit Cornea</i>
Smad	<i>SMA and MAD related proteins</i> . Proteínas relacionadas con las SMA y MAD
TBCT	Trabeculectomía
TGFα	<i>Transforming Growth Factor α</i> . Factor de crecimiento transformante α
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i> . Factor de crecimiento transformante β
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i> . Factor de necrosis tumoral α
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> . Factor de crecimiento vascular endotelial
W₁/O/W₂	Emulsión agua/aceite/agua
WKD	Wong-Kilbourne derivado de conjuntiva Chang
XTT	<i>2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida</i>

Introducción

1. GENERALIDADES

El glaucoma es un conjunto de entidades clínicas que tienen como denominador común la afectación del nervio óptico en relación, generalmente, al incremento de la presión intraocular (PIO). Su defecto anatómico más característico es el aumento de la excavación del nervio óptico y la repercusión funcional es la pérdida progresiva del campo visual.

Constituye la principal causa de ceguera irreversible a nivel mundial, afectando aproximadamente a 66,8 millones de personas, de las cuales 6,7 millones sufren ceguera bilateral (Quigley, 1996). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), empleando criterios más restrictivos para el diagnóstico de ceguera legal (agudeza visual menor de 20/500), esta entidad es responsable del 12,3% de las cegueras (4,5 millones de personas en el año 2002) (Resnikoff, et al., 2004). La mayoría de los glaucomas son asintomáticos hasta fases avanzadas de la enfermedad. Por ello, se estima que hasta el 50% de los pacientes afectados están sin diagnosticar (Tielsch et al., 1991).

Los glaucomas pueden clasificarse de distintas formas atendiendo a su origen (congénito o adquirido), morfología del ángulo iridocorneal (abierto o cerrado), y clínica (agudo, subagudo o crónico). Además, existen formas primarias y secundarias en función de la presencia o ausencia de una causa subyacente. La forma más frecuente de glaucoma es el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA).

El principal factor de riesgo para la aparición y progresión del glaucoma es el incremento de la PIO (Kass, et al., 2002, Leske, et al., 2003). Asimismo, el único tratamiento que consigue frenar el avance del glaucoma es la reducción de la PIO, sea mediante fármacos, láser o cirugía.

2. DINÁMICA DEL HUMOR ACUOSO

El desequilibrio entre la producción y el drenaje del humor acuoso es responsable del incremento de la PIO, el cual es el principal mecanismo patogénico del glaucoma.

2.1. Presión intraocular

Es la presión resultante del equilibrio entre la producción de humor acuoso y su eliminación hacia la circulación venosa. La ecuación de Goldmann mide la interrelación entre los factores determinantes de la PIO:

$$P_0 = F / C + P_v$$

En otras palabras, la PIO (P_0) es igual a la proporción entre la formación (F) y facilidad de eliminación (C) de humor acuoso, más la presión venosa episcleral (P_v). Generalmente la elevación de la PIO se debe a un incremento en la resistencia de drenaje (disminución de C) y, en raras ocasiones, a una elevación en la presión venosa (P_v). En la práctica, el exceso de formación de humor acuoso (F) nunca es causa de un incremento en la PIO.

2.2. Humor acuoso

Es el fluido que rellena el segmento anterior ocular, originado a partir del epitelio no pigmentado de los procesos ciliares. Sus funciones son diversas: aporte nutricional y eliminación de metabolitos de córnea, trabéculo y cristalino (dado que se trata de tejidos avasculares) y mantenimiento de la PIO (necesaria para la integridad óptica y estructural del globo ocular).

El humor acuoso es un fluido procedente del plasma sanguíneo que, a diferencia de éste, está casi desprovisto de proteínas, contiene una mayor cantidad de ascorbato y es ligeramente ácido e hipertónico. Su tasa de producción es de 2 μ l/min en condiciones normales y sufre una reducción progresiva con la edad (2% por década) (Burgoyne, et al., 2005).

La síntesis del acuoso se lleva a cabo por tres mecanismos:

- Transporte activo (secreción)

Es su principal vía de producción. Conlleva cierto gasto energético para el transporte de sodio, otros iones y ciertas macromoléculas (ascorbato y aminoácidos) hacia la cámara posterior. La difusión del agua se realiza a

favor del gradiente osmótico creado por el sodio. En este mecanismo están implicadas la ATPasa y anhidrasa carbónica.

- Ultrafiltración

Consiste en el paso de agua y ciertas moléculas hidrosolubles a favor de la presión hidrostática y del gradiente osmótico, a través de microporos de la membrana celular.

- Difusión

Conlleva el paso de moléculas liposolubles a través de la parte lipídica de la membrana celular, a favor de gradiente osmótico.

2.3. Eliminación del humor acuoso

Se lleva a cabo a través de dos sistemas: el convencional o trabecular y el no convencional o uveoescleral. La vía trabecular es dependiente de la presión y representa el 90% del total; la vía uveoescleral es independiente de la presión y equivale al 10% restante (Hill, et al., 1971).

2.3.1. Eliminación trabecular

Se realiza a través de distintos elementos anatómicos: malla trabecular, canal de Schlemm, canales colectores, venas del acuoso y sistema venoso episcleral.

2.3.1.1. Malla trabecular

Es un tejido reticular situado en el surco escleral y delimitado anteriormente por la línea de Schwalbe y posteriormente por el espolón escleral. Funciona como una válvula unidireccional para el flujo del acuoso, permitiendo su paso cuando sube la PIO y colapsándose cuando ésta desciende, evitando así la difusión de plasma y células sanguíneas a la cámara anterior. Consta de tres estratos:

- Trabéculo uveal

Estrato interno, limitante con la cámara anterior. Se trata de un retículo de colágeno cubierto por endotelio. Al presentar poros de gran tamaño (25-75 μm), no ofrece resistencia al drenaje del acuoso.

- Trabéculo corneoescleral

Estrato intermedio, constituido por entre 5 y 9 subestratos de colágeno, recubierto por endotelio y perforado por poros de 5-50 μm . Al igual que el trabéculo uveal, no tiene efecto en la resistencia al drenaje del acuoso (McEwen, 1958).

- Tejido conectivo yuxtacanalicular

Estrato interno, formado por el endotelio del canal de Schlemm, por la porción más externa del trabéculo corneoescleral y por el tejido conectivo laxo dispuesto entre ambas estructuras. Está constituido por componentes típicos de la matriz extracelular del tejido conectivo y células fibroblásticas. Entre los primeros se encuentran el colágeno tipo I, III, IV, V y VI, elastina, laminina, fibronectina y glicosaminoglicanos (Johnson, 2006) Existen evidencias experimentales que implican al tejido conectivo yuxtacanalicular como el lugar que aporta mayor resistencia al drenaje del acuoso (Mäepea et al., 1992).

2.3.1.2. Canal de Schlemm

Se trata de un canal que discurre circunferencialmente alrededor del globo ocular, tapizado por tejido endotelial. Se encuentra abierto en situaciones de PIO reducida y se colapsa al ascender ésta. Este colapso no parece aportar suficiente resistencia como para originar un glaucoma, pero sí como para empeorarlo (Van Buskirk, 1976). El endotelio de la pared interna de este canal tiene características histológicas diferenciales: asienta sobre una membrana basal discontinua, presenta vacuolas gigantes, y poros distales en dichas vacuolas. Estos elementos podrían determinar un "efecto embudo", que podría modular la resistencia al drenaje del acuoso derivada del tejido conectivo yuxtacanalicular (Johnson, 1992).

2.3.1.3. Canales colectores

Surgen de la pared externa del canal de Schlemm para desembocar en las venas del acuoso, las cuales lo hacen en los plexos venosos intraescleral, epiescleral y subconjuntival. La presión venosa epiescleral oscila entre 8 y 12

mmHg por lo que, si la PIO es inferior a ésta, el drenaje se realizaría únicamente a través de la vía uveoescleral.

2.3.2. Eliminación uveoescleral

Vía secundaria para el drenaje del acuoso que, a diferencia de la vía trabecular, es relativamente PIO independiente. En esta vía, el acuoso penetra en el músculo ciliar a partir del cuerpo ciliar, raíz del iris y trabéculo uveal, difundiendo posteriormente al espacio supraciliar y supracoroideo. Finalmente, el acuoso deja el ojo a través de la esclera y de los espacios perinerviosos y perivasculares. La principal resistencia para el drenaje uveoescleral se encuentra en el tono del músculo ciliar. Así, los fármacos que contraen el músculo ciliar (como la pilocarpina), disminuyen esta vía y los factores que lo relajan (como la atropina), la potencian (Alm, et al., 2009).

2.4. Dinámica del acuoso en el glaucoma

En el glaucoma se han evidenciado ciertos cambios histológicos en las estructuras implicadas en el drenaje del acuoso.

2.4.1. Trabéculo

De forma paralela al envejecimiento, se ha observado una reducción de la celularidad trabecular, así como una fusión entre trabéculas adyacentes (Grierson et al., 1987). Asimismo se ha detectado un incremento en el depósito de matriz extracelular en el tejido yuxtacanalicular (Lütjen-Drecoll et al., 1986).

2.4.2. Músculo ciliar

En el humano existe un acúmulo progresivo de matriz extracelular entre los haces musculares del músculo ciliar. Este hecho se hace todavía más evidente en los pacientes glaucomatosos (Tamm, et al., 1992).

En conjunto, el incremento en la producción de matriz extracelular, la disminución en la síntesis de metaloproteasas, y la aparición de cambios cualitativos en la matriz que la hacen más resistente a la acción de las proteasas, alteran el balance entre depósito-degradación hacia el depósito. (Gabelt, et al., 2005). Estos hechos se traducen en un aumento en la resistencia

al drenaje trabecular y uveoescleral que conllevan un incremento en la PIO, a pesar de la reducción en la síntesis de acuoso existente con la edad (Becker, et al., 1958).

3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL GLAUCOMA

A pesar de los avances en el campo de la neuroprotección y neurorregeneración, el tratamiento más habitual para el glaucoma consiste en la reducción de la PIO. Este objetivo se puede alcanzar mediante fármacos hipotensores oculares (tópicos o sistémicos), laser o cirugía incisional. La mayoría de los pacientes con glaucoma son tratados inicialmente con medicación tópica. La cirugía como tratamiento inicial se reserva para situaciones especiales (p.ej. sujetos con glaucoma avanzado, PIO alta y escasas expectativas de cumplimiento terapéutico; EUGS, 2008). Sin embargo, existen argumentos a favor de la cirugía precoz: permite alcanzar cifras tensionales inferiores y menos fluctuantes (Migdal, et al., 1994), evita la falta de cumplimiento terapéutico (Olthoff, et al., 2005) y evita los efectos secundarios locales y sistémicos derivados de los fármacos.

Con la excepción de los procedimientos ciclodestructivos, que tratan de disminuir la producción de humor acuoso, la mayoría de las intervenciones quirúrgicas antiglaucomatosas persiguen aumentar su drenaje. De entre las técnicas quirúrgicas, las más empleadas son la trabeculectomía, la esclerectomía profunda no perforante y el implante de dispositivos de drenaje (valvulados o no valvulados).

3.1. Trabeculectomía (TBCT)

Técnica descrita por Sugar en 1961 (Sugar, 1961) y popularizada por Cairns, (Cairns, 1968) que constituye en la actualidad la técnica filtrante más empleada en la cirugía antiglaucomatosa (figura 1). Consiste en la creación de un drenaje externo hacia el espacio subconjuntival, que da lugar a la formación de una elevación conjuntival denominada ampolla filtrante. Frente a los procedimientos de espesor total, se trata de un "procedimiento protegido", en el que la filtración se realiza de forma controlada por un colgajo escleral situado en la superficie de la esclerotomía. A pesar de que en sus

orígenes la esclerotomía perseguía la escisión de una porción de trabéculo, la mayoría de los cirujanos realizan en la actualidad una esclerotomía más anterior, a fin de reducir las complicaciones intraoperatorias.

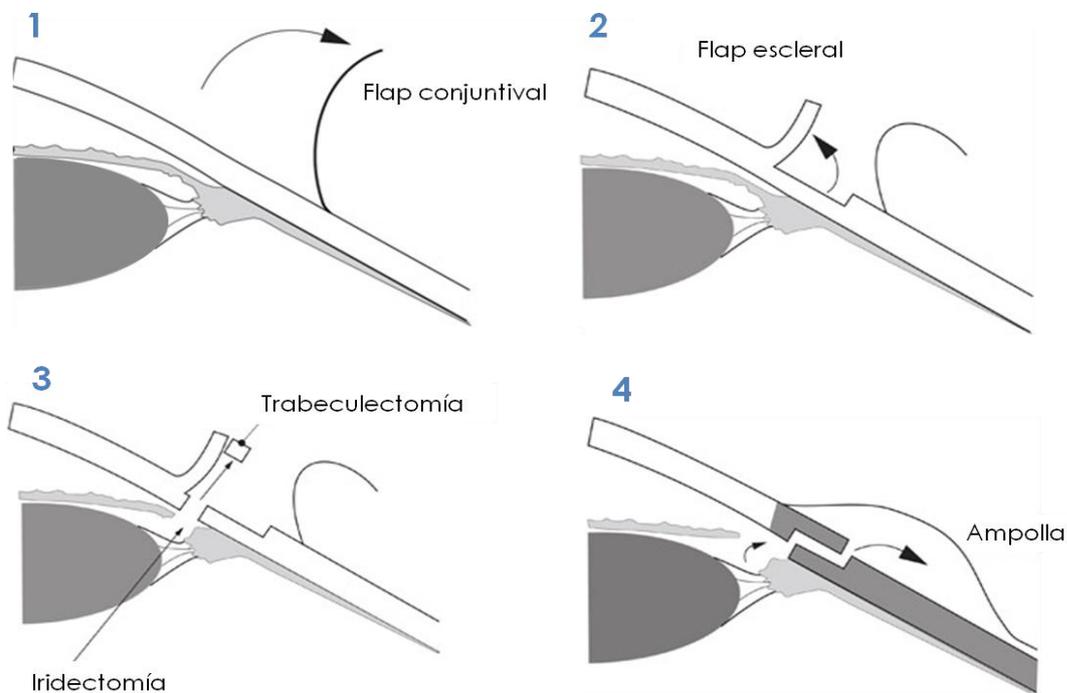


Figura 1. Secuencia de la trabeculectomía. Disección del *flap* conjuntival (1). Disección del *flap* escleral (2). Trabeculectomía e iridectomía (3). Sutura y formación de ampolla (4)

3.2. Otras técnicas quirúrgicas

3.2.1. Esclerectomía profunda no perforante (EPNP)

Krasnov, en 1968, propuso la eliminación de la pared externa del canal de Schlemm para favorecer el drenaje del acuoso (Krasnov, et al., 1968). Esta técnica, denominada sinusotomía, constituye la base de las técnicas quirúrgicas no perforantes antiglaucomatosas. De ellas, la más empleada es la EPNP, descrita por Fyodorov (Fyodorov, et al., 1989). En ella se elimina el techo del Schlemm (esclerectomía) así como la región de mayor resistencia para el drenaje del acuoso: el suelo del Schlemm y el tejido conectivo yuxtacanalicular. Posteriormente Kozlov propuso el empleo de implantes a fin de crear una cámara de descompresión intraescleral (Kozlov et al., 1990). La EPNP cuenta con menor número de complicaciones que la TBCT, dado que permite una salida de humor acuoso más controlada. Está especialmente

indicada en glaucomas que presentan más frecuentemente complicaciones asociadas a la descompresión intraoperatoria: glaucoma miópico, afáquico y glaucoma por aumento en la presión venosa episcleral.

3.2.2. Dispositivos de Drenaje

Se trata de dispositivos destinados a canalizar la filtración del humor acuoso hasta el espacio subconjuntival ecuatorial. Se basan en dos conceptos introducidos por Molteno: el incremento del área subconjuntival de filtración del acuoso (Molteno, 1969), y la necesidad de abocar el tubo a una zona más alejada que la conjuntiva limbar (Molteno et al., 1976). Debido a la aparición de complicaciones derivadas de la ausencia de restricción a la filtración en los dispositivos de Molteno, Krupin (Krupin, et al., 1976) y, más recientemente, Ahmed, (Coleman et al., 1995) han desarrollado dispositivos valvulados. En conjunto, los dispositivos de drenaje son empleados en nuestro medio para tratar aquellos glaucomas en los que fracasan las técnicas quirúrgicas convencionales. Además, existen dos formas de glaucoma en las que se suelen emplear como técnica electiva: el glaucoma neovascular y el glaucoma asociado a síndromes iridocorneales endoteliales.

3.3. La ampolla filtrante

Constituye el área de elevación de la conjuntiva situada sobre la zona de drenaje del humor acuoso. Su existencia es un indicador de funcionalidad de la cirugía filtrante (Azura-Blanco et al., 1998) (figura 2). Las características morfológicas de la ampolla filtrante son muy variables. En el postoperatorio precoz tiene aspecto edematoso e hiperémico, haciéndose más elevada según transcurren las semanas. En fases tardías su apariencia puede ser localizada o difusa, pudiendo variar en altura, palidez y extensión del edema microquístico.

Por efecto de esta variabilidad, se han propuesto diversas clasificaciones atendiendo a distintos aspectos morfológicos. Picht y Grehn emplearon como parámetros la presencia o ausencia de microquistes, la cantidad, área y diámetro de los vasos conjuntivales, la presencia o ausencia de encapsulación y la altura de la ampolla (Picht, et al., 1998). Más recientemente, se han

propuesto clasificaciones como la del Moorfields (Clarke, et al., 2003) o de Indiana (Cantor et al., 2003), que miden distintas características de la ampolla (altura, extensión, vascularización, etc.) en relación a fotografías estándar.



Figura 2. Ampolla filtrante tras trabeculectomía experimental en el conejo albino

3.3.1. Características histológicas

Histológicamente, las ampollas funcionantes presentan un tejido conectivo subepitelial laxo que contiene espacios vacíos llamados microquistes. Los microquistes actúan como canales destinados a dirigir el acuoso hacia la superficie ocular (drenaje transconjuntival). Según estudios recientes, estos quistes podrían corresponder a células caliciformes confluentes, desprovistas casi totalmente de mucina (Amar et al., 2008).

3.3.2. Dinámica de filtración en la trabeculectomía

Existen ciertos aspectos que hacen que la dinámica del acuoso tras trabeculectomía difiera de la dinámica en condiciones normales:

- Alteración en la composición del humor acuoso

Según algunos autores, los pacientes glaucomatosos podrían presentar alteraciones cualitativas en el acuoso. Se ha señalado que, a diferencia del acuoso de los pacientes con glaucoma, el acuoso procedente de sujetos con catarata inhibe la proliferación de los fibroblastos conjuntivales en cultivo. Asimismo, en la TBCT, la creación de una comunicación entre la cámara anterior y el espacio subconjuntival, priva al humor acuoso de la acción

fagocítica trabecular, alterándose secundariamente su composición (Yu, et al., 2009).

- Paso del humor acuoso al espacio subconjuntival

A diferencia de lo que ocurre en condiciones normales, en la trabeculectomía existe una difusión de humor acuoso al espacio subconjuntival. Este hecho conlleva la formación de la ampolla filtrante, de la cual se elimina el humor acuoso por cuatro rutas: transconjuntival, venosa, linfática y, probablemente, uveoescleral (Yu, et al., 2009). En condiciones normales no existe comunicación entre el sistema linfático y el sistema de drenaje del acuoso. Sin embargo, en la trabeculectomía los vasos linfáticos podrían regular la funcionalidad de la ampolla a largo plazo, mediante la eliminación de macromoléculas del espacio intersticial (Yu, et al., 2009).

4. MODULACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN TRAS TRABECULECTOMÍA

La principal causa de fracaso de la TBCT radica en la fibrosis conjuntival y epiescleral a nivel de la ampolla filtrante (Hitchings, et al., 1983). Se han desarrollado diversas estrategias encaminadas a modular la cicatrización conjuntival y epiescleral, a fin de prolongar la supervivencia de la ampolla y, por consiguiente, la función visual del paciente con glaucoma. Dado que estas estrategias actúan de manera diferente en cada fase de la cicatrización, es necesario definir previamente este proceso.

4.1. Proceso de cicatrización conjuntival

El daño tisular inducido por un traumatismo, independientemente del origen de éste, trae consigo el desencadenamiento de una secuencia de procesos biológicos, destinados a la reparación tisular. La reparación de los tejidos implica dos tipos de procesos: sustitución y regeneración. Por sustitución se conoce al proceso abocado a la cicatrización tisular. En contraste, la regeneración implica la restauración de la histología original. La conjuntiva, como la mayoría de los tejidos, combina ambos procesos cuando sufre un traumatismo quirúrgico (Lama, et al., 2003).

La secuencia de reparación conjuntival tras la realización de una trabeculectomía abarca los siguientes procesos (figura 3):

- Respuesta vascular

La lesión vascular da lugar a la trasudación de plasma, proteínas y células sanguíneas en la herida quirúrgica.

- Coagulación

La exposición del endotelio vascular estimula la agregación plaquetaria y la cascada de coagulación. El depósito de fibrina y fibronectina determina la formación del coágulo.

- Inflamación

La liberación de citoquinas plaquetarias (factor de crecimiento transformante α y β ; TGF α , TGF β y factor de crecimiento derivado de las plaquetas; PDGF) da lugar a la activación de la cascada del complemento y a la liberación de productos del metabolismo del ácido araquidónico. Estas sustancias son quimiotácticas para los neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Los neutrófilos son las primeras células en llegar a la herida quirúrgica. Su función consiste en la eliminación de material extraño en la herida, así como la liberación de citoquinas proinflamatorias (interleuquina-1; IL-1 y factor de necrosis tumoral α ; TNF α). Los monocitos constituyen el segundo tipo celular que llega al lecho quirúrgico. Tras transformarse en macrófagos, estimulan la proliferación y migración de los fibroblastos.

- Proliferación

Los fibroblastos sintetizan matriz extracelular que actúa como soporte para la migración endotelial y angiogénesis. La neovascularización permite el aporte de nutrientes a los fibroblastos que, al proliferar, dan lugar a la formación del tejido de granulación. Los linfocitos tienen un papel regulador sobre los mecanismos de reparación, activando o inhibiendo a otros tipos celulares como los macrófagos o fibroblastos.

- Remodelación

El colágeno formado da origen a la cicatriz, la cual experimenta un proceso de remodelación. La remodelación implica procesos de síntesis de colágeno, colagenolisis y contracción de la cicatriz por efecto de los miofibroblastos. Estas células surgen por transdiferenciación de los fibroblastos, por efecto de las citoquinas. Su actividad, mediada por la vía Rho-quinasa, da lugar a la contracción y ordenación de las fibras de colágeno. Una vez finalizada la contracción de la cicatriz, los miofibroblastos se hacen quiescentes y entran en un proceso de apoptosis.

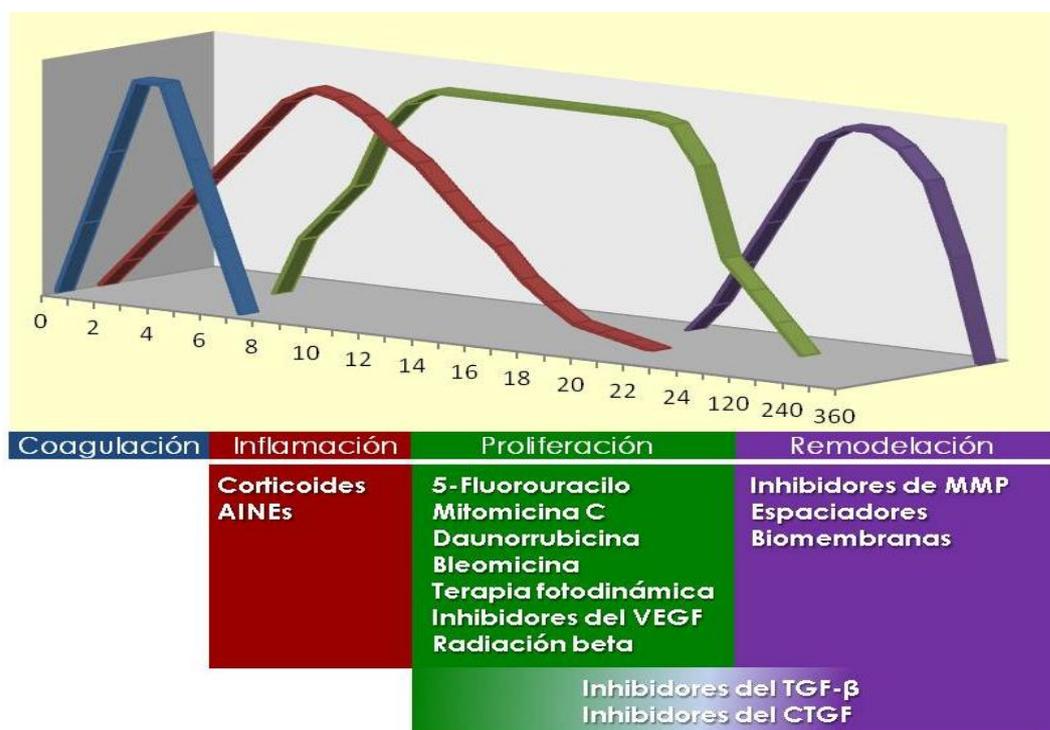


Figura 3. Fases del proceso de cicatrización conjuntival y estrategias terapéuticas para su modulación

4.2. Antiinflamatorios

La modulación de la inflamación tiene un papel determinante en la curación de la trabeculectomía. Los principales antiinflamatorios son los corticoides y los antiinflamatorios no esteroideos.

4.2.1. Corticoides

Los corticoides sintéticos son un grupo de fármacos con acción antiinflamatoria, inmunomoduladora e inhibitoria en el proceso de

cicatrización de las heridas. Su mecanismo de acción depende de la unión del corticoide al receptor citoplasmático, formando un complejo que, tras pasar al núcleo celular, regula la expresión de diversos genes. Se clasifican en función de su potencia en relación al cortisol (corticoide endógeno) y de su vida media (tabla 1).

Tabla 1. Características de los corticoides

Corticoide	Dosis equivalente (mg)	Vida media
Hidrocortisona	20	Corta
Cortisona	25	Corta
Prednisona	5	Media
Prednisolona	5	Media
Metilprednisolona	4	Media
Triamcinolona	4	Media
Dexametasona	0,75	Prolongada

La potencia también depende de la capacidad de penetración tisular del fármaco, debido a su liposolubilidad. Así, el acetato de prednisolona tiene mayor efecto intraocular que la forma fosfato por su mayor penetración corneal. Sin embargo, este hecho no tiene importancia a nivel conjuntival.

Son fármacos usados rutinariamente en el postoperatorio de la TBCT por vía tópica, dado que han demostrado aportar beneficios en lo que respecta a la reducción de la PIO (Araujo, et al., 1995). Algunos autores promulgan su empleo tópico preoperatorio, a fin de disminuir la infiltración celular inflamatoria en la fase precoz de cicatrización (Broadway, et al., 1996). Sin embargo, el pretratamiento con corticoides no se ha extendido en la práctica quirúrgica habitual.

4.2.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Grupo heterogéneo de fármacos con actividad antiinflamatoria, analgésica y antitérmica. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la ciclooxigenasa, impidiendo la metabolización del ácido araquidónico y, por consiguiente, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Los más empleados en oftalmología, generalmente en forma tópica, son el diclofenaco, quetorolaco, flurbiprofeno e indometacina.

Dado que presentan un efecto antiinflamatorio inferior al de los corticoides, han sido empleados en raras ocasiones en el postoperatorio del glaucoma.

4.3. Antimitóticos

Son fármacos destinados a disminuir la proliferación fibroblástica a nivel de la conjuntiva y cápsula de Tenon en la ampolla filtrante. La introducción de la mitomicina C (MMC) y del 5-fluorouracilo (5-FU) ha mejorado considerablemente el pronóstico de la cirugía filtrante antiglaucomatosa. Este hecho se hace especialmente patente en glaucomas con elevado riesgo de fracaso quirúrgico como el glaucoma afáquico y pseudoafáquico, glaucoma juvenil, glaucoma inflamatorio, y el glaucoma en raza negra.

4.3.1. 5-Fluorouracilo

Constituye el primer antimitótico empleado para mejorar la eficacia de la trabeculectomía. Su efecto antimitótico deriva de la inhibición del metabolismo de las pirimidinas. Concretamente, inhibe la síntesis del ADN celular (fase S) al bloquear la acción de la timidilato sintetasa, necesaria para la síntesis de timina.

Se ha constatado mediante cultivos celulares que el 5-FU inhibe la proliferación de los fibroblastos y que dicho efecto se mantiene de forma prolongada tras la exposición al fármaco durante 5 minutos (Khaw, et al., 1992, a-c) Así mismo, se ha evidenciado en modelos experimentales en el mono, que la inyección postoperatoria subconjuntival de 5-FU mejora la funcionalidad de la ampolla filtrante (Gressel, et al., 1984). A partir de estos hallazgos, diversos autores han empleado este fármaco en el postoperatorio de la TBCT, en casos con alto riesgo de fracaso (Heuer, et al., 1984; Heuer, et al., 1986). Smith fue el primer autor en emplear intraoperatoriamente 5-FU, obteniendo resultados satisfactorios por medio de su aplicación tópica (Smith, et al., 1992).

- 5-FU postoperatorio

Numerosos estudios demuestran la eficacia del 5-FU subconjuntival postoperatorio en la cirugía filtrante antiglaucomatosa. En conjunto, estos trabajos reportan un beneficio significativo en términos de supervivencia de la

ampolla y éxito quirúrgico, definido por la PIO alcanzada en relación a pacientes que no recibían el fármaco (tabla 2). Esta superioridad del 5-FU se hace manifiesta en los primeros años tras la intervención, tras los cuales, la tasa de fracaso de la TBCT se iguala a la de los controles. El Fluorouracil Filtering Surgery Study (FFSS) es un estudio multicéntrico, prospectivo y randomizado en el que se analizaba la funcionalidad de la trabeculectomía en pacientes de alto riesgo de fracaso. Como tratamiento adyuvante se administraban inyecciones subconjuntivales de 5-FU en el postoperatorio. Con un seguimiento de 5 años, el grupo de 5-FU presentó un 51% de fracasos, frente a un 74% en el grupo control (FFSS, 1996).

El 5-FU también se ha empleado en el tratamiento de dos cuadros típicos del postoperatorio de la TBCT: el quiste de Tenon (Ophir, et al., 1992) y la fibrosis tardía de la ampolla (Shin, et al., 1993). En ambos casos se suele inyectar subconjuntivalmente una dosis de 5 mg (0,1 ml de solución de 5-FU a concentración de 50 mg/ml).

Tabla 2. Estudios con 5-FU postoperatorio

Autores	N	Diseño	Dosis	Resultados
Heuer, et al.	104	Glaucomas de alto riesgo, controles históricos	Inyecciones 3-5 mg (105 mg en 2 semanas)	69% éxito con 5-FU vs 39% en controles históricos
FFSS group	213	Prospectivo, randomizado, glaucomas de alto riesgo	Inyecciones de 5 mg (105 mg en 2 semanas)	49% éxito 5-FU vs 26% en controles
Araie, et al.	362	Prospectivo, no randomizado, glaucomas de alto riesgo	36,8 ± 19,7 mg en GPAA; 49,5 ± 18 en glaucoma secundario	PIO < 16 mmHg a 5 años: 55,2% 5-FU vs 0% en controles
Goldenfeld, et al.	62	Prospectivo, randomizado, glaucomas de bajo riesgo	5 Inyecciones de 5 mg (2 semanas)	94% éxito 5-FU vs 73% en controles
Ruderman, et al.	26	Prospectivo, randomizado, glaucomas de bajo riesgo	1 inyección de 5 mg diaria (1 semana)	85,7% éxito 5-FU vs 25% en controles

- 5-FU intraoperatorio

El empleo intraoperatorio tópico de 5-FU reduce el riesgo de toxicidad epitelial típico de las inyecciones subconjuntivales, así como las molestias propias de la inyección (tabla 3). Su eficacia en la TBCT ha sido constatada en pacientes de bajo riesgo de fracaso quirúrgico. En pacientes de alto riesgo es necesario

combinar la aplicación tópica intraoperatoria con la administración subconjuntival postoperatoria. La pauta más habitual consiste en la administración tópica durante 5 minutos mediante una esponja quirúrgica de una solución de 50 mg/ml del fármaco.

Tabla 3. Estudios con 5-FU intraoperatorio

Autores	N	Diseño	Dosis	Resultados
Dietze, et al.	20	Consecutivo	50 mg/ml, 5 minutos	84% éxito a 3 meses
Anand, et al.	75	Prospectivo, no randomizado, glaucomas de riesgo variable	25 mg/ml, 5 minutos	81% éxito a 12 meses
Bell, et al.	45	Retrospectivo, glaucomas de alto riesgo	25 mg/ml, 5 minutos	49% éxito a 2 años
Sidoti, et al.	41	Retrospectivo, glaucomas de bajo riesgo	50 mg/ml, 5 minutos Inyecciones postoperatorias	85% éxito a 12 meses

- Efectos secundarios

La toxicidad epitelial corneal es el efecto secundario más frecuente y característico. Presenta distintas formas clínicas: queratitis punteada superficial, queratopatía filamentosa y defecto epitelial persistente. Se asocia principalmente a las inyecciones sunconjuntivales de 5-FU. Existen otras complicaciones potenciales más inespecíficas como la hipotonía ocular y la endoftalmitis tardía.

4.3.2. Mitomicina C

Antibiótico con propiedades antiproliferativas derivado del hongo *streptomyces caespitosus*. Pertenece al grupo de los agentes alquilantes no específicos del ciclo celular, por lo que actúa inhibiendo no sólo la replicación del ADN, sino también la síntesis del ARN y proteínas.

La MMC ha demostrado su eficacia en la prolongación de la supervivencia de la ampolla filtrante (Chen, et al., 1990). Este hecho se debe a su acción inhibitoria sobre la proliferación de fibroblastos y células endoteliales durante la cicatrización. Su potencia es alrededor de 100 veces superior a la del 5-FU, dando lugar a ampollas filtrantes más delgadas y avasculares. Este hecho se ha constatado tras la observación de una rápida recuperación de los

fibroblastos *in vitro* tras exposición al 5-FU a diferencia de la MMC, (Khaw, et al., 1993) y por el menor grado de inhibición de la proliferación endotelial que ejerce el 5-FU en comparación con la MMC (Smith, et al., 1994).

- MMC Intraoperatoria

Si bien no existe un método estandarizado para la aplicación de MMC, la mayoría de los autores se inclinan por su empleo intraoperatorio. La aplicación del fármaco se realiza en el espacio subconjuntival, mediante una esponja quirúrgica embebida en MMC (0,2 – 0,5 mg/ml), durante durante 2-5 minutos. El área de aplicación se relaciona con el resultado quirúrgico, de forma que áreas pequeñas dan lugar a ampollas quísticas de paredes delgadas y áreas más extensas a ampollas difusas, mejor toleradas por el paciente (Cordeiro, et al., 1997). A pesar de las notables diferencias existentes en cuanto a la técnica quirúrgica, modo de aplicación del antimetabólico y tipo de glaucoma, la MMC aumenta de forma significativa la tasa de éxito de la TBCT en glaucomas de alto riesgo frente a controles (tabla 4).

Tabla 4. Estudios con MMC intraoperatoria

Autores	N	Diseño	Dosis	Resultados
Costa, et al.	28	Prospectivo, randomizado	0,2 mg/ml, 3 minutos	75% éxito vs 28% en controles, a 24 meses
Martini, et al.	66	Prospectivo, randomizado	0,1 mg/ml	96% éxito vs 73% en controles, a 1 año
Andreanos, et al.	46	Prospectivo, randomizado Reintervención glaucoma	0,4 mg/ml, 2-3 minutos	83% éxito vs 63% en controles, a 18 meses

- MMC postoperatoria

La MMC se ha empleado en el postoperatorio de la TBCT como tratamiento de la fibrosis precoz (Apostolov, et al., 1997) y tardía (Mardelli, et al., 1996). En estos casos se han realizado inyecciones subconjuntivales de 0,01 mg (0,25 ml de solución de MMC a concentración de 0,04 mg/ml) y de 0,004 mg respectivamente (0,01 ml de MMC a concentración de 0,4 mg/ml).

- Efectos secundarios

Debido a la mayor potencia antimetabólica de la MMC, sus efectos secundarios son más frecuentes y severos que los del 5-FU. La MMC da lugar a ampollas

avasculares de paredes delgadas, las cuales pueden presentar escapes focales de acuoso bien sea en el postoperatorio precoz o tardío. Estos escapes pueden dar lugar a hipotonía ocular y endoftalmitis. La hipotonía ocular se ha hecho más frecuente por el empleo de antimetabólicos en la cirugía filtrante. Sus consecuencias visuales pueden ser variadas, incluyendo el desprendimiento de coroides, maculopatía hipotónica, aplanamiento de cámara anterior, descompensación corneal y formación de cataratas.

4.3.3. Otros antimetabólicos

- Daunorrubicina

Antibiótico de la familia de las antraciclinas, derivado del hongo *streptomyces peucetius var caesius*. Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la síntesis de ADN y ARN por un proceso de intercalación, alquilación de proteínas del ADN, bloqueo de la topoisomerasa II y formación de radicales libres. A pesar de no ser específico para una fase del ciclo celular, es un fármaco más tóxico para las células en fase S (Rabowsky, et al., 1996). Presenta un efecto inhibitorio sobre la proliferación y migración de los fibroblastos (Lee, et al., 1990). Su empleo en la cirugía filtrante en humano ha sido testimonial. Según Demailly, la daunorrubicina es inferior al 5-FU en la prolongación de la supervivencia de la ampolla filtrante, mediante una pauta de inyecciones subconjuntivales (Demailly, et al., 1992).

- Bleomicina

Es un antibiótico antineoplásico derivado del hongo *streptomyces verticillus*. Su acción citotóxica se lleva a cabo mediante la inhibición de la síntesis del ADN, tras provocar una alteración estructural del ADN mono y bicatenario. Aunque no se ha empleado en la cirugía filtrante del humano, en el conejo ha demostrado ser superior a la MMC en la reducción de la PIO cuando se combina con la técnica de la electroporación. Esta técnica consiste en la aplicación de pulsos eléctricos cortos que dan lugar a la formación de poros en la membrana celular que facilitan la penetración de moléculas grandes como la bleomicina (Oshima, et al., 1999).

4.4. Otros tratamientos

4.4.1. Radiación beta

La radiación beta ha demostrado inhibir la proliferación de los fibroblastos de la cápsula de Tenon tanto en ensayos *in vitro* (Khaw, et al., 1991) como en modelos animales (Miller, et al., 1990). Por ello ha sido empleada como tratamiento coadyuvante en la cirugía filtrante antiglaucomatosa, generalmente a partir del isótopo estroncio-90. De los trabajos publicados se desprende que la radiación beta mejora el pronóstico de la cirugía filtrante en glaucomas de bajo y moderado riesgo de fracaso. El grado de mejora en la tasa de éxito postquirúrgico parece similar al de MMC y 5-FU, sin embargo no existe ningún trabajo que compare la radiación beta con otros antimetabólicos (Kirwan, et al., 2009). El principal inconveniente de este tratamiento es la cataratogénesis; no obstante, este efecto es testimonial con las dosis empleadas (< 3000 rad).

4.4.2. Inhibidores de factores de crecimiento

Los antimetabólicos tienen una acción citotóxica importante provocando la apoptosis celular, y, en ocasiones, dando lugar a complicaciones severas postoperatorias. Por ello se busca desarrollar fármacos más selectivos sobre moléculas implicadas en el proceso de cicatrización como los factores de crecimiento. Entre ellos los más implicados en este proceso son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF β), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1). Algunos de ellos han sido estudiados en el ámbito de la cirugía filtrante antiglaucomatosa.

4.4.2.1. Inhibidores del TGF β

El TGF β comprende una familia de polipéptidos sintetizados por múltiples tipos celulares, con diversas acciones sobre la proliferación, diferenciación celular y cicatrización. Normalmente son sintetizados en forma de precursor inactivo, el cual tras ser activado, se une a los receptores de membrana correspondientes.

Existen tres isoformas de esta molécula: TGF β 1, TGF β 2 (predominante a nivel ocular) y TGF β 3. Está implicado no sólo en la cicatrización, sino también en la patogénesis del glaucoma. Así, favorece el depósito de matriz extracelular en el trabéculo, media el remodelado de la matriz extracelular de la lámina cribosa y promueve la cicatrización conjuntival tras cirugía filtrante. En los pacientes glaucomatosos existe un incremento de la concentración de TGF β 2 en el acuoso, predominantemente en su forma activa (Tripathi, et al., 1994). Las tres isoformas del TGF β han demostrado, en ensayos *in vitro*, favorecer la proliferación y migración de los fibroblastos de la cápsula de Tenon, así como estimular la contracción del colágeno (Cordeiro, et al., 2000). Dado que el TGF β parece ser más potente que otros factores de crecimiento en el proceso de cicatrización, se han empleado diversas estrategias para bloquear su actividad (Khaw, et al., 1994):

- Anticuerpos monoclonales

El lederlimumab (CAT-152; Cambridge Antibody Technology) es un anticuerpo monoclonal anti-TGF β 2 que ha demostrado en el conejo mejorar los resultados de la cirugía filtrante, dando lugar a ampollas filtrantes más fisiológicas que las obtenidas con MMC (Cordeiro, et al., 1999). Asimismo parece ser superior al 5-FU en cuanto a resultados tensionales y efectos secundarios postoperatorios. Sin embargo, en humano, un ensayo clínico en fase III ha evidenciado la no superioridad del CAT-152 frente al placebo tras trabeculectomía, mediante una pauta de inyecciones subconjuntivales postoperatorias (CAT-152 0102 Trabeculectomy Study Group, 2007).

- Oligonucleótidos antisentido

Son secuencias de ADN o ARN complementarias a la secuencia genética del TGF β que, al unirse al ARNm, previenen su transcripción y, por consiguiente, su síntesis. Su administración única subconjuntival intraoperatoria ha demostrado ser eficaz y bien tolerada en conejo y ratón (Cordeiro, et al., 2003).

- Silenciadores de ARN (SiARN)

Son secuencias de ARN de doble cadena específicas para una secuencia de ARNm, que es inactivada tras su unión con el SiARN. Los SiARN frente al

receptor II del TGF β han demostrado ser eficaces *in vivo* e *in vitro* inhibiendo la migración de los fibroblastos mediada por el TGF β (Nakamura, et al., 2004).

- Inhibición de la señal intracelular del TGF β

La acción intracelular del TGF β se inicia con su unión a los receptores tipo I y II (pertenecientes a la familia serina-treonina quinasa) y la fosforilación secundaria de unas proteínas denominadas Smad. Las proteínas Smad se clasifican en tres grupos: R-Smad (reguladas por receptor), Co-Smad (Co-mediadoras) e I-Smad (inhibitorias). Las R-Smad (Smad 1, 3, 5 y 8) compiten con las I-Smad (Smad 6 y 7) en la formación de complejos con la Co-Smad (Smad 4). Los complejos activados, tras su translocación al núcleo celular, inducen la activación transcripcional de ciertos genes diana. Se ha postulado que podría existir un beneficio terapéutico en el glaucoma mediante la inhibición de las R-Smad (principalmente la Smad-3) (Leask, et al., 2004) o mediante la activación de las I-Smad (principalmente la Smad-7) (Schiller, et al., 2004).

La expresión genética inducida por el TGF β está mediada por distintas moléculas de la familia MAPK (proteín quinasa activada por mitógeno). La MAPK p38 regula la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos inducida por el TGF β . La inhibición farmacológica del p38 ha demostrado *in vitro* detener esta transdiferenciación, lo cual representaría un beneficio en la fase tardía de la cicatrización tras cirugía filtrante (Meyer-Ter-Vehn, et al., 2006).

- Otros inhibidores del TGF β

Existen ciertos fármacos que, de manera secundaria a su acción principal, inhiben al TGF β . El tranilast es un fármaco antialérgico que inhibe la síntesis de colágeno mediante la inhibición del TGF β 1 (Georgoulas, et al., 2008). Su administración tópica tras TBCT en el humano permite la formación de ampollas filtrantes con mayor funcionalidad (Chihara, et al., 2002). La suramina es un fármaco antiparasitario con efecto antineoplásico que inhibe diversos factores de crecimiento como el TGF β , PDGF, EGF, bFGF e IGF, y que ha mostrado cierta superioridad sobre la MMC tras cirugía filtrante en el conejo

(Mietz, et al., 1998). El interferón α (IFN α) es una citoquina con efecto anticicatrizante, al inhibir la acción de los fibroblastos. Sin embargo no ha superado los resultados de otros antifibroticos en la prevención de la fibrosis conjuntival tras TBCT (Gillies, et al., 1999). Por último, la decorina es un inhibidor natural del TGF β , por tanto sin el potencial inmunogénico de los anticuerpos monoclonales, que ha demostrado su eficacia en la reducción de la PIO tras cirugía filtrante en el conejo (Grisanti, et al., 2005).

4.4.2.2. Inhibidores del CTGF

El CTGF es un factor de crecimiento cuya síntesis es desencadenada por el TGF β , que favorece el depósito de matriz extracelular, la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos y la fibrosis. La inhibición del CTGF mediante anticuerpos policlonales anti-CTGF y mediante oligonucleótidos antisentido ha demostrado prolongar la supervivencia de la ampolla en un modelo de cirugía filtrante en el conejo (Sherwood, 2006).

Las estatinas son fármacos hipocolesterolemiantes con acción anticicatrizante. Este hecho se debe a que inhiben al TGF β y CTGF, bloqueando la transdiferenciación de los fibroblastos. Su acción parece deberse a la inhibición de las GTPasas Rho, mediadoras de la organización del citoesqueleto, adhesión y motilidad celular (Meyer-Ter-Vehn, et al., 2008). La subfamilia Rho es un conjunto de GTPasas con acción sobre la organización del citoesqueleto cuyo sustrato, denominado ROCK I, ha demostrado tener efecto en la adherencia celular en cultivos de fibroblastos. La inhibición del ROCK I mediante la molécula Y-27632 ha permitido inactivar la proliferación, contracción y transdiferenciación de los fibroblastos de la cápsula de Tenon. De hecho, mediante la aplicación tópica de Y-27632 se ha logrado reducir la PIO y prolongar la supervivencia de la ampolla filtrante en el conejo (Honjo, et al., 2007).

4.4.2.3. Inhibidores del VEGF

El VEGF es una glicoproteína que comparte el 20% de su estructura con el PDGF. En el humano se han descrito cinco genes que codifican esta proteína: VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D y PlGF (factor de crecimiento placentario).

De ellos el más estudiado es el VEGF A, del cual se han descrito seis isoformas: 121, 145, 165, 183, 189 y 206 (Gabhann, et al., 2008). Es el principal factor de crecimiento implicado en la angiogénesis ocular. El bloqueo de la angiogénesis tras cirugía filtrante trae consigo una reducción en la inflamación, proliferación y migración de fibroblastos a la herida quirúrgica y, por consiguiente, un enlentecimiento en la cicatrización. Por otra parte, en el glaucoma se ha demostrado un aumento de la concentración de VEGF en el humor acuoso (Tripathi, et al., 1998). Este incremento parece tener un origen local, al no tener un correlato a nivel general.

El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal frente al VEGF que ha demostrado *in vitro* un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los fibroblastos de la cápsula de Tenon inducida por el VEGF (Li, et al., 2009). Asimismo, en modelos de cirugía experimental antiglaucomatosa en conejo, su administración subconjuntival postoperatoria ha demostrado prolongar la supervivencia de la ampolla filtrante (Memarzadeh, et al., 2009, Li, et al., 2009, How, et al., 2010). En el humano, en un estudio prospectivo no randomizado y no controlado, la administración subconjuntival simple postoperatoria del fármaco ha mostrado una reducción en la tasa de fracaso tras TBCT (Grewal, et al., 2008).

El pegaptanib sódico es un aptámero que inhibe de forma selectiva la isoforma VEGF₁₆₅. Esta molécula ha permitido prolongar la supervivencia de la ampolla filtrante mediante su administración subconjuntival simple o repetida tras la cirugía filtrante. Su efecto parece deberse más a su actividad antiangiogénica que antiinflamatoria o anticicatrizante, a diferencia del bevacizumab. Este hecho pone en evidencia el diferente papel de cada isoforma de VEGF en la cicatrización ocular, siendo el VEGF₁₆₅ y VEGF₁₂₁ más antiangiogénicos, y el VEGF₁₈₉ más antifibrótico (Van Bergen, et al., 2011).

El ranibizumab es un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado, dirigido contra el VEGF humano. Su administración intravítrea, combinada con MMC tópica intraoperatoria ha permitido mejorar algunas características de la

ampolla filtrante al cabo de 6 meses de la trabeculectomía en el humano, si bien, sin incrementar el efecto hipotensor de la MMC aislada (Kahook, 2010).

4.4.3. Terapia fotodinámica

Técnica que consiste en la administración de un fotosensibilizador que, al ser fotoactivado, da lugar a citotoxicidad local directa e indirecta (por el daño vascular ocasionado). Ha demostrado su eficacia *in vitro* en la destrucción de los fibroblastos de la cápsula de Tenon (Grisanti, et al., 1999). En un modelo de cirugía filtrante en el conejo, la administración intravenosa de verteporfino ha permitido obtener ampollas más funcionantes y menores cifras de PIO que en los animales control (Stasi, et al., 2006). En el humano, los resultados han sido prometedores, si bien no se han realizado ensayos prospectivos randomizados por el momento (Diestelhorst, et al., 2002, Jordan, et al., 2003).

4.4.4. Inhibidores de las metaloproteasas

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) son una familia de proteasas encargadas de modelar los componentes de la matriz extracelular. Se dividen en cinco grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas y metaloproteasas tipo membrana. Su actividad se relaciona con la embriogénesis, desarrollo y cicatrización. El empleo de inhibidores sintéticos de las MMP, como el ilomastato ha demostrado interferir ciertas funciones de los fibroblastos *in vitro* como la síntesis y contracción del colágeno. Además, la degradación de la matriz por efecto de las MMP facilita la migración celular a la herida quirúrgica, de modo que el ilomastato disminuye la celularidad y, por consiguiente, la cicatrización (Daniels, et al., 2003). En modelos experimentales de cirugía filtrante, este fármaco ha demostrado prolongar la supervivencia de la ampolla al tiempo que reduce la PIO de forma significativa (Wong, et al., 2003). A pesar de no superar la tasa de éxito quirúrgico de la MMC, este fármaco ha dado lugar a la aparición de ampollas filtrantes más fisiológicas que ésta, desde un punto de vista histológico (Wong, et al., 2005). En un estudio comparativo frente a distintos tratamientos tras TBCT experimental, ha presentado resultados superiores a los de los inhibidores de CTGF y TGF β , pero inferiores a los de la MMC (Sherwood, et al., 2006).

4.4.5. Espaciadores y biomembranas

El mantenimiento de un espacio subconjuntival amplio y libre de adherencias se relaciona con un mejor funcionamiento de la cirugía filtrante (Molteno, et al., 1969). Los espaciadores son materiales biodegradables interpuestos en el espacio subconjuntival destinados a mantenerlo libre de adherencias en las fases tempranas del proceso de cicatrización, así como a prevenir la hiperfiltración precoz. Las biomembranas son implantes biodegradables que combinan las propiedades mecánicas de los espaciadores junto con propiedades anticicatrizantes.

- Hialuronato sódico

Es el componente más empleado como agente viscoelástico en la cirugía intraocular. Su utilidad para la cirugía filtrante reside en sus propiedades mecánicas para el mantenimiento del espacio subconjuntival y en sus propiedades anticicatrizantes, dado que disminuye la motilidad, proliferación y actividad metabólica de los fibroblastos *in vitro* (Alpar, 1986). En humanos, en un estudio prospectivo randomizado, la administración subconjuntival de hialuronato sódico al 2,3% durante la TBCT no ha permitido mejorar las tasas de éxito quirúrgico, sin embargo ha contribuido a la formación de ampollas filtrantes más difusas (Lopes, et al., 2006).

- Metilcelulosa

Agente viscoelástico que, en un modelo experimental de cirugía filtrante en el conejo, ha permitido reducir de forma significativa la PIO postoperatoria al ser inyectado en el espacio subconjuntival y en la cámara anterior. Los autores concluyen que este efecto se debería más a un efecto anticicatrizante que a su acción como mantenedor de espacios (Shouman, et al., 2006).

- Ácido hialorónico - carboximetilcelulosa (Seprafilm®)

Biomembrana formada por la asociación de dos polisacáridos, empleada para prevenir adherencias en cirugía abdominal. Se trata de una membrana bidegradable que desaparece al cabo de una semana tras su colocación en el espacio subconjuntival. Ensayos *in vivo* realizados en modelos experimentales de TBCT en el conejo, demuestran que esta biomembrana

además de proporcionar menores cifras de PIO, origina ampollas formadas por tejido más laxo, con menor adherencia esclero-conjuntival y con menor expresión de marcadores propios de los miofibroblastos. Estos resultados indican que combina el efecto mecánico de separación de conjuntiva y esclera con un efecto inhibitorio sobre la fibrosis y contracción del colágeno (Tsurumaru, et al., 2009, Takeuchi, et al., 2009).

- Celulosa oxidada regenerada (Interceed®)

Biomembrana hemostática con efecto barrera empleada en cirugía ginecológica y abdominal. Estudios en TBCT experimental en el conejo demuestran la ausencia de diferencias macroscópicas entre las ampollas obtenidas con esta biomembrana y las de los controles. Sin embargo, sí existen diferencias en cuanto a la celularidad y al menor número de neovasos. De hecho, la presencia de esta membrana da lugar a un incremento en el número de macrófagos, destinados a realizar la degradación de la membrana, al tiempo que dejan de secretar citoquinas proinflamatorias (Akyol, et al., 2005 y 2008).

- Polímeros de colágeno – glicosaminoglicanos (Ologen®)

Permiten una reducción en la hiperfiltración precoz tras TBCT, a la vez que favorecen la reorganización de fibroblastos, miofibroblastos y colágeno de una forma más laxa, disminuyendo la cicatrización. Su empleo en un modelo de TBCT en el conejo ha permitido un mayor control de la PIO, mejorando las características histológicas de la ampolla (Chen, et al., 2006). Algunos autores los consideran una posible alternativa a la MMC en la TBCT, en función de los resultados obtenidos en humano (Cillino, et al., 2011)

- Membrana amniótica

Las propiedades antifibróticas, antiangiogénicas y antiinflamatorias de la membrana amniótica han permitido mejorar los resultados de la TBCT en modelos experimentales en conejo (Barton, et al., 2001) y en sujetos con glaucoma de alto riesgo de fracaso quirúrgico (Bruno, et al., 2006). Al parecer, la eficacia de la membrana se debería a su efecto inhibitorio sobre la acción fibrogénica del TGF β y sobre la diferenciación de los miofibroblastos.

5. DISPOSITIVOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

La finalidad de cualquier tratamiento se basa en el mantenimiento del principio activo a la concentración adecuada en su lugar de acción. Este objetivo se ve impedido a nivel ocular por la corta vida media de los fármacos, por su absorción sistémica, dilución en la película lagrimal y drenaje lagrimal. El desarrollo de los dispositivos de liberación controlada de fármacos ha permitido mejorar estas limitaciones así como optimizar las propiedades terapéuticas de los fármacos, haciéndolos más seguros, efectivos y fiables.

5.1. Tipos de dispositivos

Desde un punto de vista histórico, los dispositivos de liberación de fármacos se han dividido en implantes, sistemas de bomba implantable y sistemas atípicos (tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de los dispositivos de liberación de fármacos

Implantes	No biodegradables	Sistemas de matriz polimérica
		Sistemas tipo reservorio
		Sistemas de polimetacrilato
		Sistemas magnéticos
	Biodegradables	Sistemas de matriz polimérica
		Sistemas tipo reservorio
Sistemas de bomba implantable	Bombas de infusión	
	Bombas peristálticas	
	Bombas osmóticas	
Sistemas atípicos	Compuestos cerámicos	
	Hidrogeles	

Los más empleados en oftalmología han sido los implantes biodegradables, bien sea de matriz polimérica o tipo reservorio. En los primeros hay una distribución homogénea del fármaco en la matriz. En cambio, en los sistemas tipo reservorio, existe una cavidad central que aglutina el principio activo, rodeada por una membrana polimérica permeable al mismo. La difusión del fármaco al medio es un proceso más rápido que el de la degradación, bien sea de la matriz o de la membrana poliméricas (Dash, et al., 1999).

Los liposomas son implantes tipo reservorio que consisten en vesículas esféricas microscópicas recubiertas de una bicapa fosfolipídica que pueden transportar moléculas tanto hidrosolubles como liposolubles. Han sido empleados como vehículo para la liberación de 5-FU en la cirugía filtrante en el conejo (Skuta, et al., 1987). Su uso oftalmológico ha perdido popularidad, dado que suelen presentar problemas de toxicidad.

5.2. Microencapsulación

El desarrollo de la microencapsulación ha permitido elaborar partículas cargadas de fármacos, que han posibilitado incrementar la dosis del fármaco sin afectar a su tolerancia, así como realizar una liberación controlada del fármaco en el medio con una duración de acción programada.

Los sistemas de liberación a base de partículas comprenden las micropartículas (menos de 1 mm) y las nanopartículas (menos de 1 μ m). Las micropartículas se dividen a su vez en microcápsulas (fármaco atrapado en una membrana polimérica) y microesferas (fármaco disperso homogéneamente en una matriz polimérica). Las nanopartículas se dividen a su vez en nanocápsulas (reservorios con una cavidad central con el fármaco disuelto) y nanoesferas (esferas poliméricas sólidas con el fármaco incorporado en superficie). Las nanopartículas difieren de las micropartículas en el tamaño lo cual limita su composición, favorece su difusión (pueden traspasar la barrera hematoencefálica) y su diana terapéutica (puede ser extracelular o intracelular).

Los materiales empleados para microencapsulación se dividen en grasas, proteínas y polímeros. Los polímeros se clasifican, a su vez en naturales (goma arábica, dextrano y quitosano), semisintéticos y sintéticos. Dentro de los polímeros sintéticos destacan los poliésteres, de naturaleza biodegradable, entre los que se encuentran el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico-glicólico (PLGA), poliortoésteres (POE) y policaprolactonas (PLC).

5.3. Microesferas

Las microesferas tienen la ventaja de presentar menor tamaño que los implantes, lo cual las capacita para ser inyectadas o para formar parte de implantes. Su degradación se realiza generalmente por procesos de hidrólisis. La hidrólisis puede ser homogénea (similar en el núcleo que en la superficie) o heterogénea, en función del tamaño de la microesfera. Así, las microesferas menores de 300 μm de diámetro se degradan de forma homogénea, y las mayores, de forma heterogénea. Además, existen otros factores que influyen en la biodegradación, como la ubicación anatómica, solubilidad, composición química, peso molecular de sus componentes, mecanismo de hidrólisis, y morfología y porosidad de la microesfera (Anderson, et al., 1997).

La biocompatibilidad viene definida por la respuesta tisular frente al dispositivo de liberación y, principalmente, frente al principio activo incorporado. En condiciones normales, la secuencia de eventos tras el implante de un dispositivo de liberación de fármacos a base de microesferas, es la siguiente:

- Inflamación aguda: infiltración de polimorfonucleares
- Inflamación crónica: infiltración de monocitos y macrófagos
- Granulación: liberación de mediadores inflamatorios, neovascularización y proliferación de fibroblastos. Formación de la cápsula fibrosa del implante.
- Reacción de cuerpo extraño: acción de los macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño (formadas por fusión de monocitos y macrófagos).
- Fibrosis tardía: fibrosis residual tras degradación del polímero.

5.4. Dispositivos de liberación en la cirugía filtrante

En el contexto de la cirugía filtrante del glaucoma se han investigado distintos materiales para ser empleados como dispositivo de liberación de fármacos. En algunos casos se han evaluado implantes impregnados por el fármaco, y en otros, implantes formados por agregación de micropartículas cargadas con el principio activo. A continuación se describen diversos materiales empleados en modelos experimentales de cirugía antiglaucomatosa. A excepción de los vinilos, los restantes son biodegradables (tabla 6). Debe tenerse en cuenta que

el proceso de biodegradación depende del tamaño, forma, localización, densidad y peso molecular del polímero empleado.

Tabla 6. Tiempos de eliminación aproximados de polímeros biodegradables

Polímero	Duración (meses)
Poli-D-Láctico	12-16
Poli-L-Láctico	18-24
Poli-Glicólico-Láctico	6-12
Policaprolactona	18-24
Poliortoésteres	12-24
Polianhídridos de alcanos	0,2-4
Polianhídridos aromáticos	6-12
Gelatina	0,2-1
Celulosa oxidada	0,2-1
Colágeno	0,2-1

5.1.1. Polianhídridos

Los polianhídridos son polímeros biodegradables sintéticos que han sido empleados en forma de disco, en modelos de cirugía filtrante en el conejo. Han demostrado mejorar la eficacia quirúrgica de la trabeculectomía al ser utilizados como dispositivos de liberación de 5-FU (Lee, et al., 1987, Jampel, et al., 1990), MMC (Charles, et al., 1991) y daunorrubicina (Rabowsky, et al., 1996). En el caso de la daunorrubicina y la MMC, se han reportado opacidades corneales relacionadas tanto con el antimetabólico como con el implante.

5.1.2. Vinilos

El acetato de etilvinilo (EVA) y el acetato de polivinilo (PVAc) son polímeros no biodegradables que han sido empleados con éxito en modelos de cirugía filtrante en monos, vehiculizando 5-FU (Blandford, et al., 1992). Se trata de polímeros inertes, sin evidencia de bioincompatibilidad, por lo que no sería necesaria su retirada en un segundo tiempo quirúrgico.

5.1.3. Colágeno

El colágeno es un polímero biodegradable de naturaleza protéica y de origen natural. Ha sido evaluado como base para la elaboración de dispositivos de

liberación de 5-FU en el conejo (Finkelstein, et al., 1991). En el mono, su empleo en un modelo de TBCT, ha ocasionado una importante reacción inflamatoria granulomatosa (Hasty, et al., 1990). En humanos, ha sido empleado para la liberación de 5-FU y bleomicina en pacientes con glaucomas de alto riesgo de fracaso quirúrgico, obteniéndose resultados satisfactorios (Herschler, 1992).

5.1.4. Poliortoésteres

Los POE son polímeros sintéticos hidrofóbicos, biodegradables y biocompatibles, empleados como sistemas de liberación de fármacos. Tienen la ventaja frente a otros polímeros de tener una cinética de liberación constante del principio activo. Se dividen en cuatro familias, de las cuales las más estudiadas en oftalmología son la de los POE III y POE IV (Heller, 2005).

Los POE III presentan una consistencia viscosa, por lo que pueden ser inyectados o implantados intraoperatoriamente. La biocompatibilidad subconjuntival ha demostrado ser aceptable en el conejo albino, tanto tras inyección del POE III aislado como del POE III cargado con 5-FU. En modelos experimentales de TBCT en conejo, los POE III con 5-FU han evidenciado prolongar la supervivencia de la ampolla y han permitido un descenso de la PIO durante 1 mes, a pesar de la reabsorción rápida del implante (aproximadamente en 2 semanas) (Einmahl, et al., 2001).

Los POE IV aportan la ventaja de tener un procedimiento de síntesis más sencillo y de presentar una consistencia semisólida. Estas circunstancias hacen que tengan unos resultados más reproducibles en cuanto a cinética de liberación de fármacos que los POE III. Se diferencian de otros POE en que incorporan a su estructura un ácido latente (generalmente ácido glicólico), responsable de la hidrólisis del implante cuando se encuentra en un ambiente acuoso. En el conejo, el tiempo de permanencia subconjuntival del POE IV cargado con 5-FU ha demostrado ser aproximadamente el doble que el del POE III (5 semanas frente a 2 semanas), dando lugar a una conjuntivitis irritativa los primeros días tras su implantación (Einmahl, et al., 2003).

5.1.5. Polihidroxiésteres

Son poliésteres biodegradables empleados en la fabricación de implantes, micropartículas y nanopartículas, que se caracterizan por su fácil formulación y por presentar una cinética de degradación predecible. De ellos, los más conocidos son el ácido poliláctico (PLA), polilácticoglicólico (PLGA) y las policaprolactonas (PLC). Muestran generalmente un patrón bifásico de liberación del principio activo, con una primera fase rápida y una segunda fase de liberación lenta. Se degradan por medio de hidrólisis en sus monómeros correspondientes (ácido láctico, glicólico y caproico), que son eliminados con una mínima toxicidad sistémica asociada.

- **Ácido poliláctico**

Es un polímero formado por monómeros de ácido láctico que presenta un tiempo de degradación prolongado (tabla 6). La inyección subconjuntival de microesferas de PLA cargadas de adriamicina ha evidenciado mejorar la supervivencia de la cirugía filtrante en el conejo. Sin embargo el efecto terapéutico *in vivo* ha tenido menor duración que en los ensayos *in vitro* del fármaco. Los autores han achacado este hecho a una mayor tasa de degradación de las microesferas *in vivo* y a una inadecuada concentración del antimitótico. En este estudio se han reportado tres casos de opacidad corneal en animales control (microesferas sin adriamicina) (Kimura, et al., 1992). Por otro lado, el empleo de implantes formados por compresión de microesferas de PLA cargadas con 5-FU, en un modelo de TBCT en el conejo, ha demostrado reducir la PIO así como prolongar la supervivencia de la ampolla. Los autores han observado una liberación bifásica, con una mayor liberación inicial, que parecía corresponder al 5-FU que recubría la superficie del implante. En lo que respecta a la toxicidad, han reportado una primera fase de hiperemia postoperatoria, de mayor duración en los animales con implante cargado de 5-FU. La concentración de 5-FU en el humor acuoso de estos animales ha sido inferior al umbral de toxicidad endotelial del fármaco (Cui, et al., 2008).

- **Ácido poliláctico-glicólico**

Es un copolímero de láctico y glicólico que ha sido empleado en la formulación de implantes y micropartículas de múltiples principios activos. Ha sido evaluado como implante para la liberación subconjuntival de 5-FU en el contexto de la cirugía filtrante en el conejo (Gould, et al., 1994, Trope, et al., 1994, Hostyn, et al., 1996). Sus resultados a corto plazo han sido satisfactorios en cuanto a la dosis de fármaco liberada, mostrando correlación con los ensayos *in vitro* (Wang, et al., 1996). La toxicidad derivada del empleo de microesferas cargadas con 5-FU ha demostrado ser baja en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* en el espacio subconjuntival en conejo (Chiang, et al., 2001). Por otra parte, el empleo de partículas de PLGA cargadas con 5-FU y recubiertas por MMC, ha alcanzado mejores resultados que las partículas de 5-FU tras TBCT en el conejo. Sin embargo estos resultados han sido inferiores a los obtenidos con MMC tópica. Según estos resultados, el 5-FU, a pesar de ser liberado de forma sostenida, muestra un efecto transitorio, inferior al de una aplicación simple de MMC intraoperatoria. Cabe destacar la observación, en algunos de los conejos tratados con MMC, de edema, neovascularización corneal y endoftalmitis (Lu, et al., 2000). Recientemente se han reportado resultados prometedores mediante el empleo de láminas subconjuntivales de PLGA impregnadas en el antimetabólico sirolimus tras TBCT experimental en el conejo (Yan, et al., 2011). Recientemente se han reportado resultados prometedores mediante el empleo de láminas subconjuntivales de PLGA impregnadas en el antimetabólico sirolimus tras TBCT experimental en el conejo (Yan, et al., 2011).

- **Policaprolactona**

Polímero biocompatible y biodegradable que presenta periodos prolongados de degradación que pueden ser reducidos mediante su copolimerización con PLA y PLGA. Ha sido empleado en la manufactura de láminas subconjuntivales en el conejo, mostrando unos resultados favorables en cuanto a tolerancia, si bien con una mayor tendencia a la encapsulación que el PLGA. Por otra parte, muestra una degradación más lenta y menos homogénea que éste, siendo el implante degradado más precozmente en su superficie (Peng, et al., 2011).

Objetivos

JUSTIFICACIÓN

- La fibrosis subconjuntival constituye la principal causa de fracaso de la cirugía filtrante antiglaucomatosa.
- Las estrategias actuales encaminadas a paliar la cicatrización no consiguen, en la mayoría de los casos, evitar el fracaso quirúrgico.
- El desarrollo de biomateriales y métodos de encapsulación deberían posibilitar el aporte farmacológico en el lugar apropiado y a la dosis idónea para contrarrestar la cicatrización y favorecer el éxito quirúrgico.

1. HIPÓTESIS

El PLGA es un material biocompatible y biodegradable capaz de hacer de soporte para la encapsulación de antimetabólicos, de forma que posibilite la liberación de éstos en el espacio subconjuntival, durante un periodo suficientemente prolongado como para incrementar la tasa de éxito quirúrgico, sin provocar fenómenos de toxicidad.

2. OBJETIVOS:

1. Evaluar mediante ensayos *in vitro* la idoneidad de la MMC y 5-FU para su encapsulación.
2. Diseñar un implante por agregación de microesferas de PLGA, capaz de realizar una liberación sostenida de antimetabólicos durante al menos un mes tanto *in vitro* sobre cultivos celulares, como *in vivo* en el ojo del conejo.
3. Evaluar un modelo de trabeculectomía experimental en conejo que permita, de forma reproducible, reducir la PIO y favorecer la formación de ampolla filtrante.
4. Analizar la eficacia como tratamiento coadyuvante de la trabeculectomía experimental, de un implante de PLGA formado por microesferas cargadas con antimetabólicos, y comparar su eficacia frente a los tratamientos convencionales (MMC y 5-FU tópicos).
5. Estudiar la utilidad del bevacizumab de forma aislada o combinado al implante de PLGA cargado con antimetabólico, como tratamiento adyuvante de la TBCT.

Material y métodos

1. PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES FARMACOLÓGICAS

Los ensayos *in vitro* realizados en esta tesis se efectuaron en los laboratorios de la empresa Bioftalmik SL (Derio, Vizcaya). Los fármacos citostáticos empleados en el estudio fueron preparados de la siguiente forma:

1.1. 5-Fluorouracilo

Se obtuvo a partir de la solución comercial de 50 mg/ml de 5-FU (Fluorouracilo Ferrer Farma EFG, Ferrer Farma, Barcelona, España). Fue empleado en forma tópica intraoperatoria, como recubrimiento de implantes de PLGA y en la realización de estudios de citotoxicidad sobre cultivos celulares. Para su aplicación tópica se empleó la concentración de 50 mg/ml. La concentración empleada en el recubrimiento fue de 66,25 mg/ml (concentración inferida a partir de la dosis letal 50 del 5-FU sobre cultivos celulares; ver apartado 1.4 de resultados). En el caso de los cultivos, se administró una concentración de 5-FU de entre 0,5 y 5000 µg/ml.

1.2. Mitomicina C

Se utilizó en forma tópica intraoperatoria, en los implantes de PLGA (en forma encapsulada o como recubrimiento de los mismos) y en los estudios de citotoxicidad sobre cultivos celulares. En los cuatro casos el fármaco se obtuvo a partir del polvo para solución inyectable (Mitomycin C, polvo para solución inyectable, Laboratorios Inibsa, Barcelona, España). Los viales de 2 mg de MMC fueron reconstituidos con suero fisiológico, obteniéndose una solución con una concentración de 0,4 mg/ml para aplicación tópica, de 1250 µg/ml para los implantes (esta concentración se obtuvo a partir de la DL₅₀ sobre cultivos celulares; ver apartado 1.4 de resultados) y de entre 0,1 y 18 µg/ml para los cultivos celulares.

1.3. Bevacizumab

El bevacizumab se administró mediante inyecciones subconjuntivales de 0,05 ml del fármaco (1,25 mg), reconstituido a partir del concentrado comercial de 25 mg/ml del fármaco (Avastin®, Roche Farma, Madrid, España).

2. DETERMINACION *IN VITRO* DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS ANTIMITÓTICOS

2.1. Líneas celulares

La citotoxicidad de los antimitóticos fue evaluada sobre dos líneas celulares (figura 1):

- **Línea celular SIRC** (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea)

Línea celular correspondiente a fibroblastos corneales de conejo. En cada uno de los 96 pocillos se sembraron 90 μ l de la suspensión celular, a una concentración de 6000 células por pocillo. Transcurrido un periodo de incubación de 24 horas, se adicionaron a cada pocillo, 10 μ l del tratamiento (soluciones a concentraciones crecientes de 5-FU y MMC). Posteriormente las células fueron cultivadas en condiciones estándar (37°C y 5% CO₂) durante 3 días en medio MEM Eagle con Earle's BSS, enriquecido con 10% de suero fetal bovino y 1% de estreptomycin / penicilina.

- **Línea celular WKD** (Wong-Kilbourne derivado de conjuntiva Chang)

Línea celular de epitelio conjuntival humano. Siguiendo la metodología anterior, en cada pocillo se sembraron 90 μ l de suspensión celular a concentración de 15000 células por pocillo. Posteriormente, tras el periodo de incubación, se adicionaron las muestras de tratamiento (soluciones de 5-FU y MMC a concentraciones crecientes), y se cultivó durante 3 días en condiciones estándar, en medio 199 (Earle's BSS y bicarbonato sódico 2,2 g/l), suplementado con 1% de glutamina, 10% de suero bovino y 1% de estreptomycin/penicilina.

En ambas líneas celulares se realizó un control microscópico diario del progreso del cultivo, analizando la ausencia de contaminación del mismo (microscopio óptico compuesto Leica DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

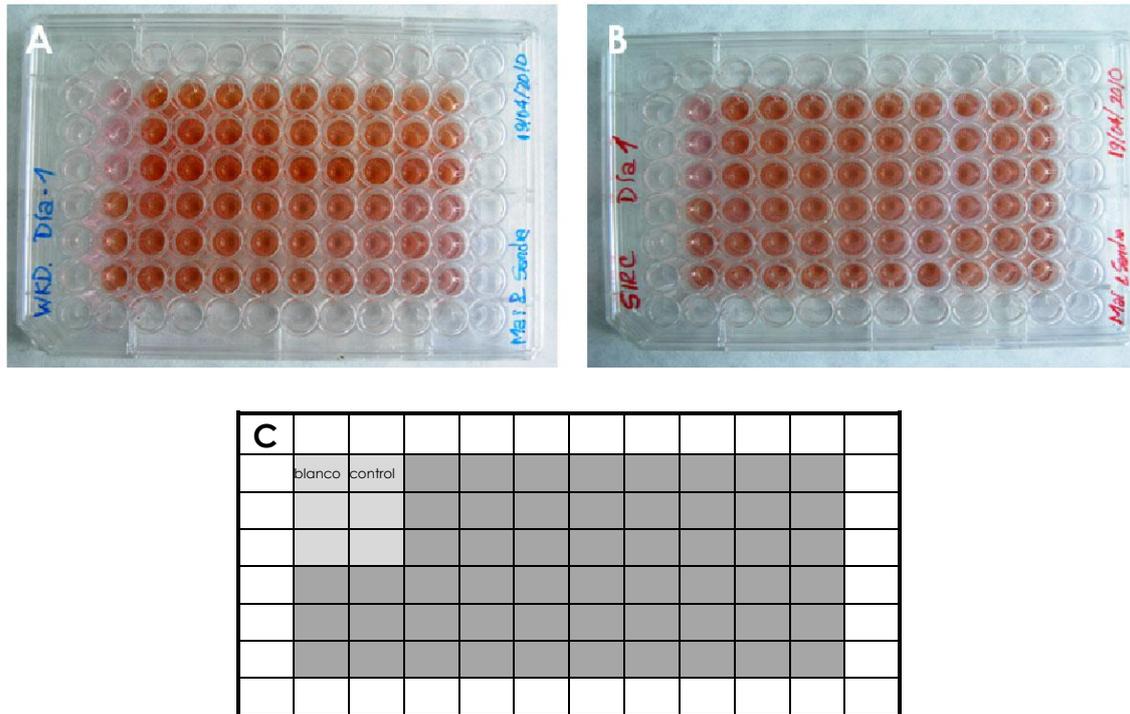


Figura 1. Microplacas de cultivos celulares. Cultivo con células WKD **(A)**. Cultivo con células SIRC **(B)**. Disposición de los cultivos en cada microplaca **(C)**

2.2. Ensayos de citotoxicidad de 5-Fluorouracilo y mitomicina C

El efecto citotóxico de cada antimetabólico fue analizado por triplicado tras la adición de distintas concentraciones del fármaco sobre los cultivos, en dos tiempos de incubación (1 y 3 días).

- Citotoxicidad del 5-FU

La dosis letal 50 (DL₅₀) fue determinada para cada línea celular mediante la evaluación de distintas concentraciones del citostático (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000 y 5000 µg/ml).

- Citotoxicidad de la MMC

De forma análoga al 5-FU, se evaluaron distintas concentraciones del fármaco sobre ambas líneas celulares (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12, y 15 µg/ml).

La evaluación de la viabilidad celular tras la administración de MMC y 5-FU se realizó por colorimetría mediante el kit XTT (Roche Molecular Biochemicals,

Mannheim, Alemania), una vez cumplidos los diferentes tiempos de incubación. Este kit se basa en el hecho de que sólo las células viables pueden realizar la reducción de *tetrazolium* (de color amarillo) a formazán (de color naranja). La cantidad de formazán y, por lo tanto, de colorante naranja formado, es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. La lectura de los resultados se realizó mediante espectrofotometría a 492 nm (Fotómetro Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos; figura 2), sobre las microplacas de cultivo, a las que se había adicionado previamente el XTT (4 horas de incubación a 37°C). A partir de los resultados se obtuvieron curvas de absorbancia en función del porcentaje de viabilidad celular

El cálculo de los resultados y la representación gráfica de las cifras de absorbancia se realizó mediante la siguiente metodología:

- Cálculo del valor promedio de las absorbancias en cada pocillo de cada réplica.
- Sustracción del valor de absorbancia de los pocillos blancos (medio sin células), tanto a los pocillos control (medio con células), como a los pocillos con MMC y 5-FU.
- Conversión de las absorbancias en porcentaje de viabilidad celular, donde el 100% representaría la absorbancia del pocillo control sin antimetabólico.
- Cálculo de la gráfica dosis-respuesta mediante el ajuste de curvas por medio de análisis de regresión (Software Sigma Plot 8.0, Systat Software Inc, SanJose, California, Estados Unidos).
- Cálculo de la DL_{50} mediante el análisis de regresión a partir de las curvas de viabilidad celular en representación semilogarítmica.



Figura 2. Fotómetro de microplacas Multiskan FC

3. FORMULACIÓN DE MICROESFERAS E IMPLANTES DE PLGA

3.1. Producción de la microesferas

Las microesferas fueron elaboradas mediante el método evaporación / extracción de solvente orgánico, a partir de la formación de una doble emulsión ($W_1/O/W_2$) (figura 3). Este método consiste en la realización de dos emulsiones encaminadas a atrapar el principio activo, y en la eliminación del solvente (diclorometano en nuestro caso) en el que está disuelto el polímero, ya sea mediante su evaporación o mediante su extracción. A continuación se describe dicho proceso, así como las dosis para la formulación para 10 implantes:

- **Emulsión primaria (W_1/O)**

Consiste en la realización de una emulsión entre un principio activo disuelto en agua (fase acuosa; W) y un solvente orgánico (fase orgánica; O). Brevemente, 250 mg de PLGA, disueltos en 5 ml de diclorometano (O) fueron emulsificados con 250 μ l (W_1) de solución fisiológica (en el caso de microesferas vacías) ó 250 μ l (W_1) de solución de MMC a concentración de 1250 μ g /ml (en el caso de microesferas cargadas). La emulsificación se realizó mediante sonicado durante 30 segundos a 50 W (Sonicador Sonoplus HD-3200, Bandelin, Sant Feliu de Llobregat, Barcelona, España).

- **Emulsión secundaria** ($W_1/O/W_2$)

Aquí, la emulsión primaria se adiciona sobre un medio acuoso que contiene un emulsificante, que actúa como un estabilizador de ésta, de forma que impide la coalescencia de las gotículas que la forman. En nuestro caso, la emulsión primaria (W_1/O) fue adicionada a 25 ml de solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) al 1% (W_2) y homogenizada a 16200 rpm durante 5 minutos (Homogenizador Ultraturrax T25, IKA, Staufen, Alemania), generándose una doble emulsión ($W_1/O/W_2$). Posteriormente se adicionaron 50 ml de alcohol isopropílico al 2% y se agitó durante una hora mediante agitador magnético (Agitador magnético RCT basic, IKA, Staufen, Alemania). Con ello se favorece la extracción de los solventes orgánicos y la precipitación de las microesferas.

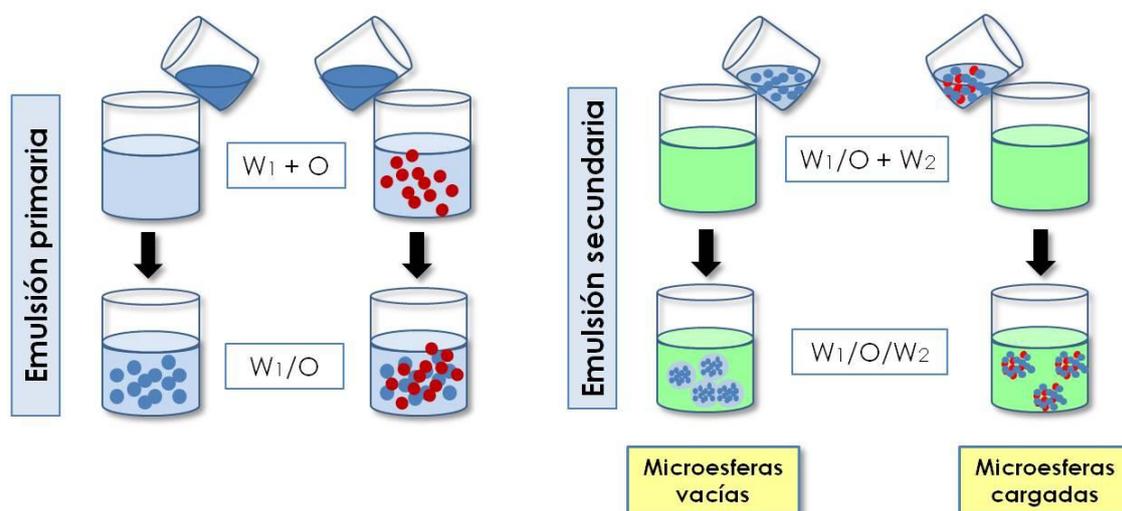


Figura 3. Esquema del método de doble emulsión para la elaboración de microesferas. W_1 = fase acuosa (solución fisiológica \pm MMC), O = fase orgánica (PLGA + solvente), W_2 = fase acuosa (solución acuosa de PVA)

3.2. Formulación de los implantes

Las microesferas fueron recogidas mediante centrifugación a 10000 g durante 5 minutos (centrifugadora Sigma 2-16 PK, Sigma, Osterode am Harz, Alemania), lavadas (3 ciclos) y resuspendidas en agua destilada, obteniéndose alícuotas de 500 ml de la suspensión de microesferas, que fueron depositadas en tubos eppendorf (figura 4). Dichos tubos fueron centrifugados a 10000 g durante 5 minutos (Centrifugadora Hettich mikro-120, Hettich Instruments, Beverly, Massachusetts, Estados Unidos), para inducir la formación del implante sólido

(figura 5). Finalmente, se obtuvieron cinco lotes de implantes (tabla 1). Uno de estos lotes presentaba microesferas vacías (Bi027) y cuatro presentaban microesferas cargadas de MMC (Bi030, Bi032, Bi034 y Bi040), dos de los cuales fueron sometidos a una última fase de recubrimiento con 50 μ l de solución de MMC (1250 μ g /ml; lote Bi030) y 50 μ l de solución de 5-FU (66,25 mg/ml; lote Bi032). Todos los implantes fueron congelados a -80°C y liofilizados durante 49,5 horas.

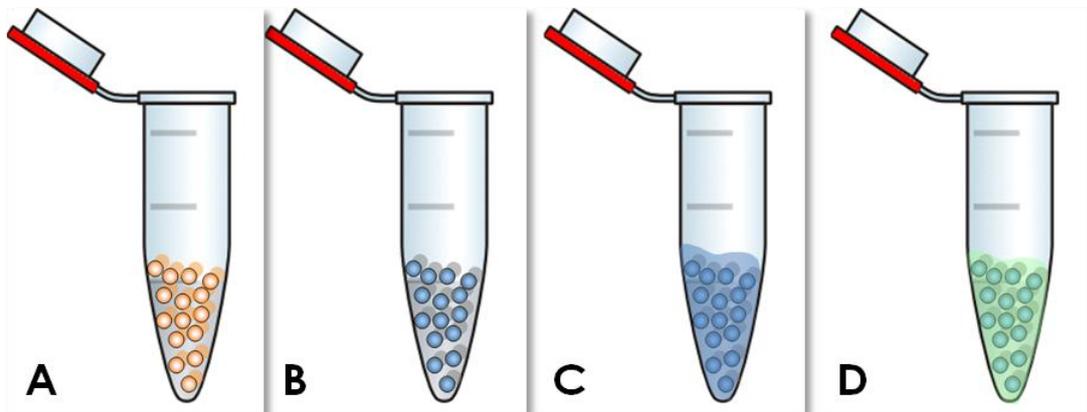


Figura 4. Esquema representativo de los cuatro tipos de eppendorf en función del contenido. Microesferas vacías (A). Microesferas con MMC (B). Microesferas con MMC y recubrimiento de MMC (C). Microesferas con MMC y recubrimiento de 5-FU (D).



Figura 5. Fotografías del desarrollo de una forma farmacéutica sólida a partir de microesferas de PLGA vacías (A). Microesferas sedimentadas (B). Implantes liofilizados (C).

Tabla 1. Lotes de implantes

Lote	Carga del implante
Bi027	Vacío
Bi030	MMC (recubrimiento con MMC)
Bi032	MMC (recubrimiento con 5-FU)
Bi034	MMC
Bi040	MMC

3.3. Radiación gamma

Los implantes fueron colocados en viales de vidrio, cerrados al vacío, sellados con anillo de aluminio e irradiados con una fuente de ^{60}Co a dosis de 25 KGy (Aragogamma, Les Franqueses del Vallés, Barcelona, España), de acuerdo con las recomendaciones de la farmacopea europea para esterilización efectiva (figura 6).

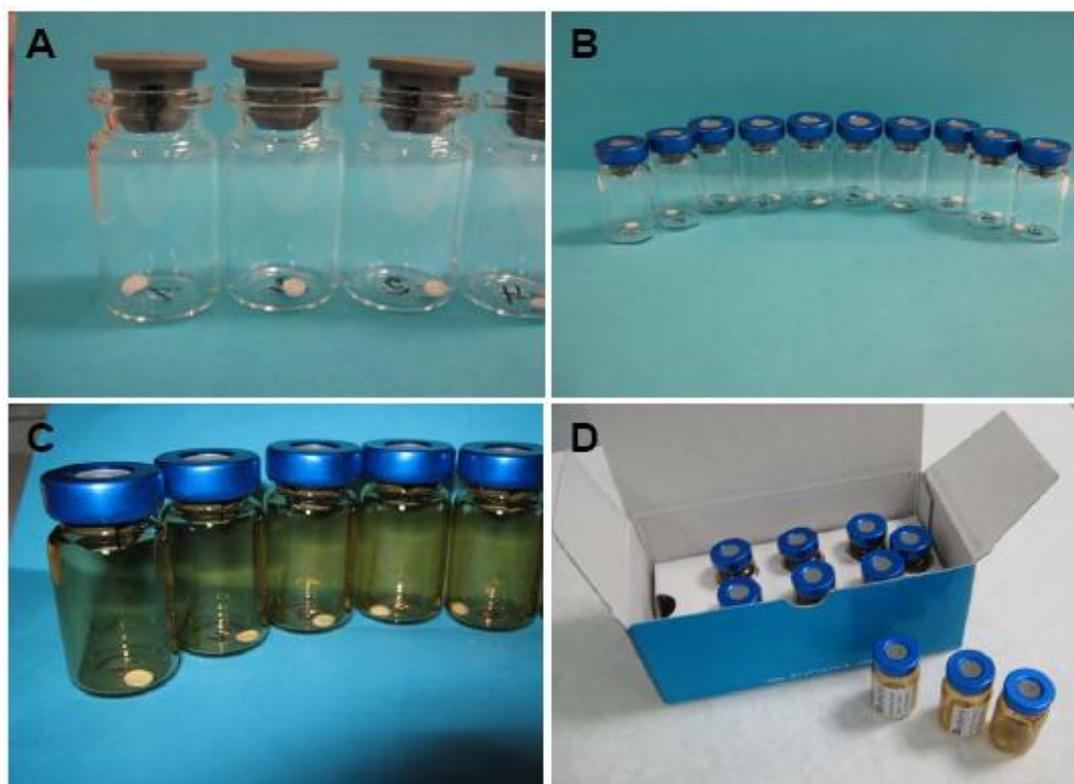


Figura 6. Fotografías de los implantes. Implantes tras liofilización (A). Implantes sellados al vacío (B). Implantes tras esterilización por radiación gamma (C). Implantes para ensayos *in vivo* (D).

3.4. Control microbiológico

Adicionalmente, se realizaron controles microbiológicos de los implantes, para lo cual 4 implantes fueron mantenidos durante 7 días en suero fetal bovino, en condiciones estándar (humedad atmosférica de 5% de CO_2 y 37°C).

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS E IMPLANTES *IN VITRO*

4.1. Caracterización morfológica

Se llevó a cabo mediante análisis con microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (scanning electronic microscopy; SEM) y difracción láser. Se realizaron tres tipos de análisis:

- **Microscopía óptica**

Se efectuó mediante microscopía óptica (Microscopio óptico compuesto Leica DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Consistió en un análisis superficial de la forma y tamaño de las micropartículas, a modo de control de calidad, durante su proceso de elaboración.

- **Microscopía electrónica de barrido**

Fue realizada en el servicio de microscopía analítica y de alta resolución en biomedicina de la Universidad del País Vasco, mediante microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Microscopio Hitachi S-4800, Hitachi, Tokio, Japón). Mediante esta tecnología se realizó un análisis de superficie de las partículas, atendiendo a su rugosidad y porosidad. Para su visualización, las muestras de microesferas e implantes (previamente seccionados con bisturí), fueron adheridas a un soporte de SEM mediante cemento conductor y recubiertas con un sombreado metálico (recubrimiento con oro, con un recubridor JEOL Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, Jeol Ltd., Tokio, Japón).

- **Diffractometría láser**

Efectuada en la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco (campus de Vitoria), mediante analizador de partículas (Analizador Coulter-Counter LS130, Amhers, Massachusetts, Estados Unidos). Se estudió el tamaño y distribución de tamaños de las partículas en tres de los lotes (Bi027, Bi030, Bi034). Este láser emplea una fuente de radiación de 750 nm de longitud de onda, con la que es posible medir partículas de 0,4 a 900 μm de diámetro mediante la aproximación de Fraunhofer. Las muestras se dispersaron en PVA al 0,1% y se midieron en agua tras agitación.

4.2. Estudio de la citotoxicidad de los implantes con mitomicina C

Este estudio se realizó para conocer el efecto citotóxico de los implantes cargados con MMC sobre las dos líneas celulares (SIRC y WKD) y, por consiguiente, la integridad del principio activo una vez liberado. Cada implante cargado con MMC fue colocado en un tubo eppendorf, resuspendido en 500 μl de solución tampón fosfato (pH 7,4) e incubado a 37°C

bajo agitación orbital durante 42 días (tiempo estimado para la degradación completa del implante). Con una periodicidad semanal durante 6 semanas (S₁, S₂, S₃, S₄, S₅, S₆), se tomaron muestras del sobrenadante, las cuales fueron sedimentadas por centrifugación a 10000 g durante 10 minutos (centrifugadora refrigerada Sigma, modelo 2-16 PK, Osterode am Harz, Alemania). Posteriormente, el sobrenadante retirado fue reemplazado por un volumen equivalente de solución tampón fresca, continuando el ensayo tras colocar cada tubo eppendorf nuevamente en agitación orbital. Todas las muestras de sobrenadante fueron congeladas a -80°C, liofilizadas y esterilizadas mediante radiación gamma (ver apartado 3.3 de material y métodos). Finalmente, cada muestra fue resuspendida y sometida a un análisis *in vitro* sobre cultivos celulares (ver apartado 2.1 de material y métodos), a fin de determinar la citotoxicidad mediada por cada implante. La determinación del porcentaje de viabilidad celular se realizó por colorimetría, mediante el kit XTT (ver apartado 2.2 de material y métodos). Estos ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las formulaciones elaboradas en cuatro réplicas de implantes.

Las muestras a analizar fueron distribuidas en dos placas de cultivo según el esquema representado en la figura 7.

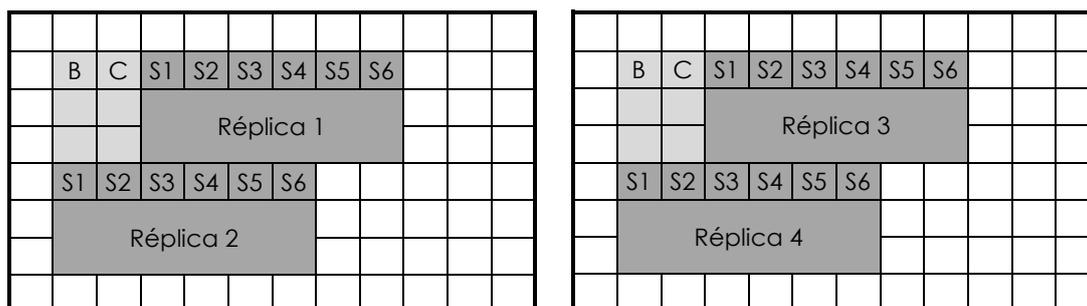


Figura 7. Disposición de las muestras en las microplacas de cultivo. **B** = Blanco. **C** = Control. **S (1-6)** = Semana (1-6).

4.3. Estudio de cinética de liberación de mitomicina C:

El estudio de la cantidad de MMC liberada por cada implante se realizó de forma indirecta, mediante la determinación de la actividad citostática de las muestras semanales obtenidas de los implantes, sobre cultivos de células SIRC.

Se decidió emplear estas células, en detrimento de las células WKD, por ser los fibroblastos las células más implicadas en el fracaso de la trabeculectomía (Hitchings, et al., 1983, Jampel, et al., 1988) y, por constituir la principal diana terapéutica para los antimetabólicos.

Para realizar este estudio era necesario obtener, de forma previa, una recta patrón del efecto de concentraciones conocidas de MMC sobre la línea celular SIRC. La determinación de la recta patrón se llevó a cabo mediante análisis colorimétrico sobre cultivos celulares (ver protocolo del apartado 2.2 de material y métodos). En este caso se analizó un mayor número de concentraciones del citostático que en el ensayo previo (tabla 2). Una vez obtenidas las absorbancias, estas fueron normalizadas y expresadas como porcentaje de viabilidad celular. Por último, se realizó el ajuste estadístico de la curva mediante análisis de regresión.

Tabla 2. Concentraciones de MMC para recta patrón

MMC (µg/ml)											
0	0,1	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,60	0,80
1	1,5	2	4	6	8	10	12	14	16	18	

En el ensayo de cinética de liberación sobre cultivos celulares se analizaron tres réplicas de implantes con MMC encapsulada (lote Bi034) y tres réplicas de implantes con MMC encapsulada y en su recubrimiento (lote Bi030). La metodología de este estudio fue la misma descrita previamente, si bien en este ensayo se emplearon únicamente las células SIRC, a diferencia del ensayo previo (apartado 4.2 de material y métodos). Brevemente, los sobrenadantes obtenidos semanalmente tras agitación de los implantes fueron congelados, liofilizados, esterilizados y finalmente analizados sobre cultivos celulares mediante colorimetría.

4.4. Eficiencia de encapsulación:

La eficiencia de encapsulación (EE) define la capacidad de carga de las micropartículas con el principio activo (MMC en nuestro caso). Este dato es un reflejo de la cantidad de principio activo del implante. Este estudio fue

realizado con dos tipos de implantes: implantes cargados con MMC (Bi034) e implantes cargados y recubiertos con MMC (Bi030). A pesar de que ambos tipos de implantes tuvieron el mismo proceso de elaboración, el lote Bi030 adjuntaba un recubrimiento de 6,25 µg de MMC por implante (Figura 8).

El cálculo de la EE se realizó a partir de la cantidad de MMC obtenida de los implantes (MMC liberada, ver apartado anterior), en relación a la cantidad de MMC empleada en el proceso de encapsulación (MMC teórica). A continuación se describe el cálculo de la carga teórica de MMC en cada prototipo de implante:

MMC teórica	
Bi034 (MMC)	
MMC total = 1250 µg/ml x 250 µl * = 312,5 µg / 10 implantes =	31,25 µg/implante†
* : 250 µl de solución de 1250 µg/ml de MMC	
† : 31,2 µg = 1,04 µg ([MMC] empleada) x 30 días (tiempo de seguimiento)	
Bi030 (MMC + MMC)	
MMC recubrimiento = 1250 µg/ml x 50 µl = 62,5 µg / 10 implantes =	6,25 µg/implante
MMC total = 31,25 µg + 6,25 µg MMC =	37,5 µg/implante

Figura 8. Cálculo de la concentración de MMC por implante en implantes con MMC encapsulada (Bi034) y con MMC encapsulada y en el recubrimiento (Bi030).

La eficiencia de encapsulación se expresa en porcentaje, y es calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% EE = \frac{\sum \text{MMC liberada}}{\text{MMC teórica}} \times 100$$

5. ANIMALES

Todos los animales de experimentación incluidos en el estudio fueron tratados conforme a las directrices sobre el uso de animales de experimentación de la "Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO, 1993).

Los experimentos que se describen en este estudio se realizaron sobre 42 conejos albinos hembra de la raza New Zealand, de pesos comprendidos entre 2,5-2,7 kg., procedentes de la granja cunícola San Bernardo SL (Tulebras, Navarra, España).

Los animales fueron acogidos en las instalaciones del estabulario de la Universidad del País Vasco (Campus de Leioa) e intervenidos tras un periodo de cuarentena de una semana. A lo largo del estudio, los animales fueron provistos de dieta y agua *ad libitum*, en condiciones estables de temperatura (21°C), bajo ciclos regulares de luz y oscuridad de 12 horas.

6. TRABECULECTOMÍA EXPERIMENTAL

6.1. Anestesia

La trabeculectomía se realizó bajo anestesia general, mediante la inyección intramuscular de 40 mg/kg de ketamina (Ketolar ® 50 mg/ml, Pfizer, Madrid, España) y 8 mg/kg de xilacina (Rompun ® 20 mg/ml, Bayer, Barcelona, España). De forma coadyuvante, se administró anestesia tópica, mediante la aplicación de dos instilaciones, separadas cinco minutos, de una mezcla de tetracaína y oxibuprocaina (Colircusí Anestésico Doble ®, Alcon-Cusí, El Masnou, Barcelona, España).

6.2. Trabeculectomía

La intervención se realizó bajo microscopía quirúrgica (Microscopio Leica M651, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíza), en todos los casos por el mismo cirujano y bajo condiciones de asepsia quirúrgica. Todas las intervenciones fueron grabadas en formato digital (Capturadora de vídeo Pinnacle Studio movie box plus S12 USB, Software Pinnacle Studio plus 12, Pinnacle Systems, Braunschweig, Alemania). La trabeculectomía se realizó bilateralmente, siendo el ojo derecho el control.

La secuencia quirúrgica fue la siguiente (figura 9):

- Colocación del blefarostato
- Sutura de tracción: colocación de un punto de sutura corneal de espesor parcial, anclado en el paño quirúrgico (Polysorb 8/0 coated, Tyco Healthcare Group, Conética, Estados Unidos)
- Peritomía conjuntival: incisión conjuntival base en fornix en cuadrantes superiores, con tijera de Wescott.
- Exposición del lecho escleral
- Tallado del colgajo escleral base en limbo: disección de un colgajo de 4 x 4 mm, extendiéndose 1 mm en córnea clara, mediante cuchillito tunelizador tipo crescent (Clearcut, Alcon, Texas, Estados Unidos).
- Paracentesis mediante cuchillito de 15° (Cuchillito angulado de 15°, Alcon, Texas, Estados Unidos).
- Trabeculectomía: disección de una porción de tejido de 1 x 3 mm a nivel trabecular, mediante cuchillito de 15°.
- Iridectomía periférica con tijera de Vannas.
- Sutura del colgajo escleral mediante dos puntos de nylon 10/0 (Nylon monofilament 10/0, CU-1 0,2 metric, Alcon, Texas, Estados Unidos)
- Sutura conjuntival mediante dos o tres puntos de sutura de nylon 10/0 (Nylon monofilament 10/0, CU-1 0,2 metric, Alcon, Texas, Estados Unidos)

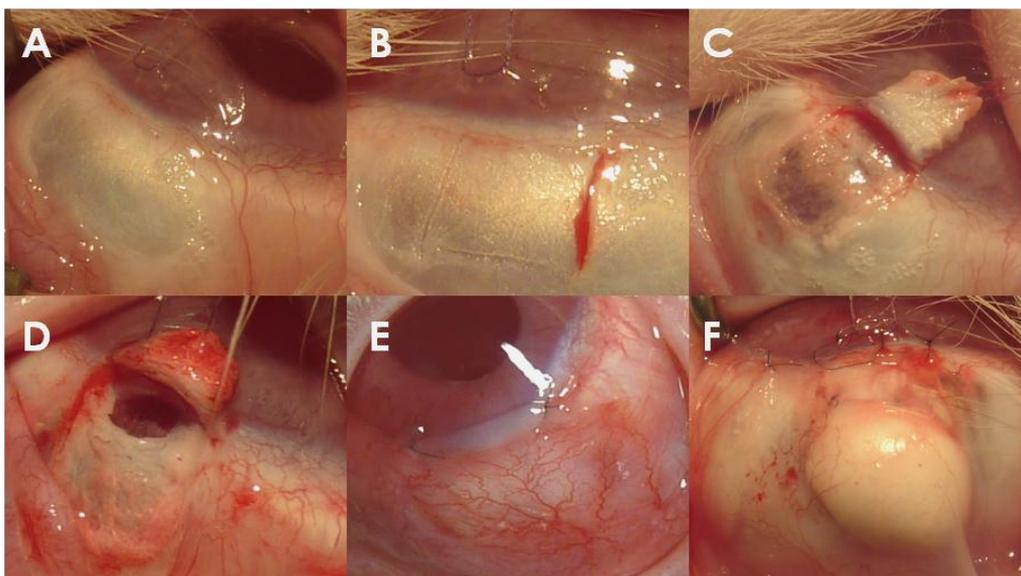


Figura 9. Secuencia quirúrgica de la trabeculectomía. Colgajo conjuntival base en fornix (A). Marcado del colgajo escleral (B). Colgajo escleral disecado (C). Trabeculectomía (D). Sutura conjuntival. Formación de ampolla filtrante (E). Implante de PLGA en espacio subconjuntival (F).

La aplicación intraoperatoria de fármacos o implantes se realizó en el ojo izquierdo de los animales de experimentación.

- Vía tópica: se empleó en el caso de la MMC y 5-FU, mediante la aplicación sobre el lecho escleral de un fragmento de gelatina porcina de 5 x 5 x 0,5 mm (Spongostan film ®, Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey, Estados Unidos), embebido en el fármaco, previamente al tallado del colgajo escleral. En ambos casos el tiempo de aplicación fue de 5 minutos, seguido por un lavado con 20 ml de suero fisiológico.
- Vía subconjuntival: se empleó para la administración de bevacizumab. Se realizó mediante la inyección con aguja de 30 G en la zona de la trabeculectomía, una vez finalizada la intervención.
- Los implantes se colocaron sobre la esclera adyacente a la trabeculectomía, previamente a la sutura conjuntival.

Al finalizar la intervención quirúrgica se instiló en cada ojo una gota de colirio de atropina al 1% (Colircusi Atropina ®, Alcon-Cusí, El Masnou, Barcelona, España) y una gota de colirio mezcla de tobramicina y dexametasona (Tobradex® colirio, Alcon-Cusí, Barcelona, España).

7. EVALUACIÓN CLÍNICA

El seguimiento clínico se realizó bajo anestesia tópica, en los siguientes momentos del estudio:

- Preoperatorio
- Postoperatorio inmediato
- Al cabo de 1, 5, 7, 14 días, 3 semanas y 1 mes de la trabeculectomía.

El examen clínico consistió en las siguientes exploraciones:

7.1. Fotografía del segmento anterior

Realizada mediante cámara digital, en condiciones estables de iluminación ambiental (Cámara Panasonic Lumix DMC-TZ7, Osaka, Japón). A cada animal de experimentación se le colocó una etiqueta identificatoria en el párpado superior.

7.2. Medición de la presión intraocular (PIO)

Se llevó a cabo mediante tonometría de rebote (Icare® VET, Icare Finland, Helsinki, Finlandia) (figura 10, B y C). Las mediciones fueron efectuadas por el mismo investigador, tras calibración previa del tonómetro. Se realizaron dos series de 6 mediciones cada una de la PIO, indicándose el valor medio de ambas series. En caso de duda sobre la validez de la medición se realizó una tercera serie, que se promedió con la más fiable de las dos previas.



Figura 10. Evaluación clínica postoperatoria. Fotografía del globo ocular en el postoperatorio inmediato **(A)**. Medición de la PIO mediante tonometría de rebote **(B,C)**

7.3. Medición de las características de la ampolla filtrante

Se realizó un análisis de la ampolla en base a la clasificación del Moorfields Hospital (Clarke, 2003). Según esta clasificación, las características de la ampolla (área, altura y vascularización) se analizan en relación a unas fotografías de referencia (figura 11). En el caso del conejo, al no existir una distinción clara entre el área central y área máxima de ampolla filtrante, empleamos únicamente el área máxima como variable de extensión de la ampolla. La determinación de la vascularidad de la ampolla se realizó de forma similar, sin discriminar entre distintas zonas dentro de la ampolla filtrante. Dada la rápida desaparición de la ampolla filtrante en el conejo, se realizó una exploración extra de la misma en el día 9.

Clasificación del Moorfields (figura 11)

- Área de la ampolla

La extensión de la ampolla se cuantificó en base al porcentaje del total de la conjuntiva visible en la fotografía ocupada por la ampolla filtrante. La puntuación tiene un valor entre 0 y 5 en función de la siguiente escala:

- 1 = 0%
- 2 = 25%
- 3 = 50%
- 4 = 75%
- 5 = 100%

- Altura de la ampolla

La altura de la zona más elevada de la ampolla se comparó con las fotografías de referencia, asignándole un valor entre 1 y 4.

- Vascularidad de la ampolla y conjuntiva sana

El grado de vascularización se determinó por comparación con las fotografías de referencia, recibiendo un valor numérico según la fotografía más similar:

- 1 = avascular
- 2 = vascularización normal
- 3 = inflamación vascular leve
- 4 = inflamación vascular moderada
- 5 = inflamación vascular severa

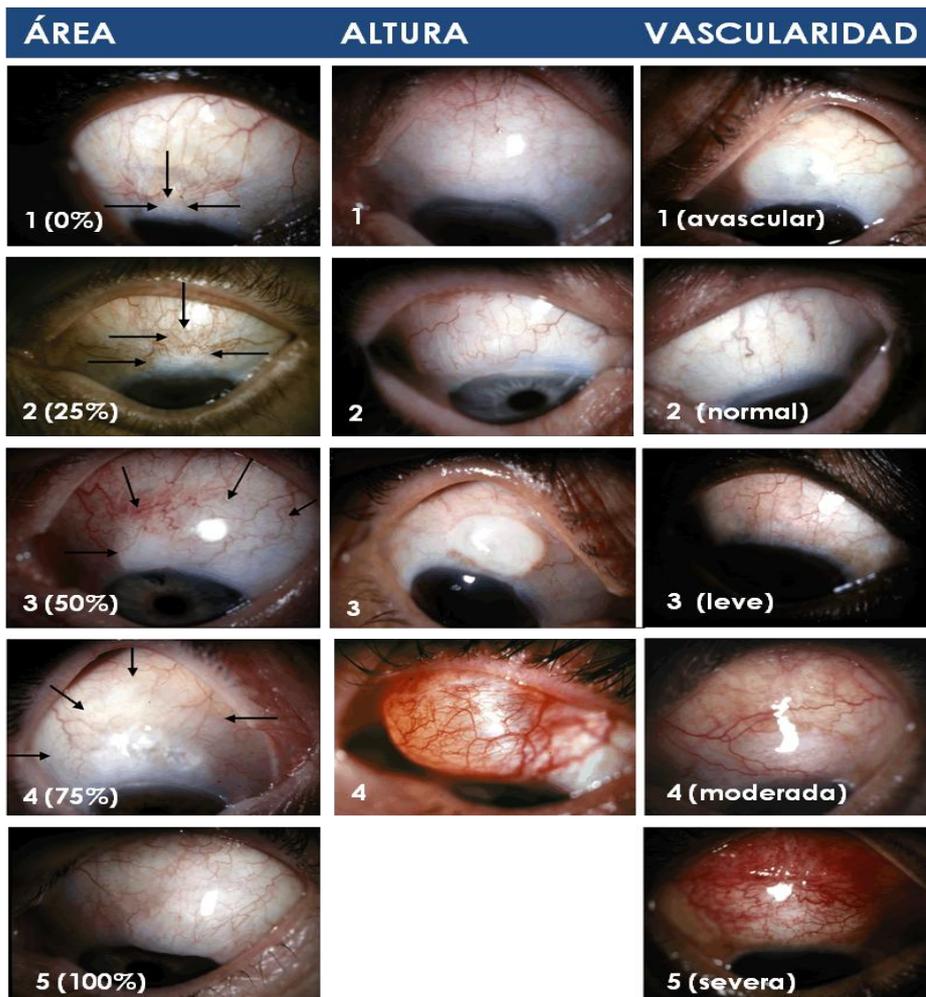


Figura 11. Clasificación de las ampollas filtrantes del Hospital Moorfields

8. EVALUACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

Concluida la fase de seguimiento clínico, se procedió al sacrificio de los animales mediante sobredosis anestésica según la técnica descrita previamente (apartado 6.1 de material y métodos), e inyección intravenosa de cloruro potásico. Tras el sacrificio de los animales se practicó la enucleación de ambos globos oculares en todos los animales del estudio. Las piezas fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, crioprotectadas en sacarosa al 30% en tampón fosfato e incluidas en OCT. Posteriormente se cortaron en criostato a 14 μm de espesor y fueron teñidas mediante hematoxilina-eosina y Verhoeff (figura 12), según la siguiente metodología:

- Tinción de hematoxilina-eosina
 - Hidratación con alcohol de 100° y 96°, 2 minutos cada uno.
 - Lavado con agua destilada.
 - Tinción con hematoxilina durante 5 minutos.
 - Lavado con agua destilada.
 - Lavado con alcohol ácido (HCl al 1% más alcohol de 70°).
 - Lavado con agua destilada.
 - Tinción con eosina durante un minuto.
 - Lavado con agua destilada.
 - Deshidratación con alcohol de 96° y 100°, 10 minutos cada uno.
 - Aclarado con dos baños de xilol, 10 minutos cada uno.

- Tinción de Verhoeff
 - Lavado con agua destilada
 - Tinción con hematoxilina de Verhoeff 30 minutos: 40 ml de hematoxilina al 5% en alcohol de 100°, 16 ml de cloruro férrico al 10% y 16 ml de solución yodada de Lugol (10 g de yoduro potásico, 5 g de yodo y 85 ml de agua destilada).
 - Lavado con agua destilada.
 - Diferenciación con cloruro férrico al 2%, 1 minuto
 - Lavado con agua destilada.
 - Contratinción con colorante de Van Gieson durante 1 minuto (45 ml de solución saturada de ácido pícrico, 1 ml de fucsina ácida al 1% y 1 ml de ácido acético).
 - Lavado con agua destilada.
 - Deshidratación con alcohol y aclarado en xilol.

El corte fue orientado teniendo como referencia los puntos de sutura de la trabeculectomía, de forma que abarcaba el área de la intervención y el área limbar control, situada a 180°. Finalmente las preparaciones fueron examinadas microscópicamente (Microscopio Axioskop 2, Zeiss, Jenna, Alemania) y fotografiadas (Coolsnap, Photometrics, Tucson, Arizona, Estados Unidos). En cada corte se examinaron dos áreas: el área de la trabeculectomía y el área control, situada en el limbo esclerocorneal opuesto

a ésta. En ambas localizaciones se observaron las características del epitelio (espesor, celularidad y presencia de células caliciformes). En la zona de la trabeculectomía se analizó asimismo la infiltración celular del estroma conjuntival, la presencia de ampolla filtrante y el grado de persistencia del implante. La realización de las preparaciones se realizó en el Departamento de Biología Celular de la Universidad del País Vasco. El análisis microscópico se efectuó en el Servicio de Anatomía Patológica del Oncológico de San Sebastián.

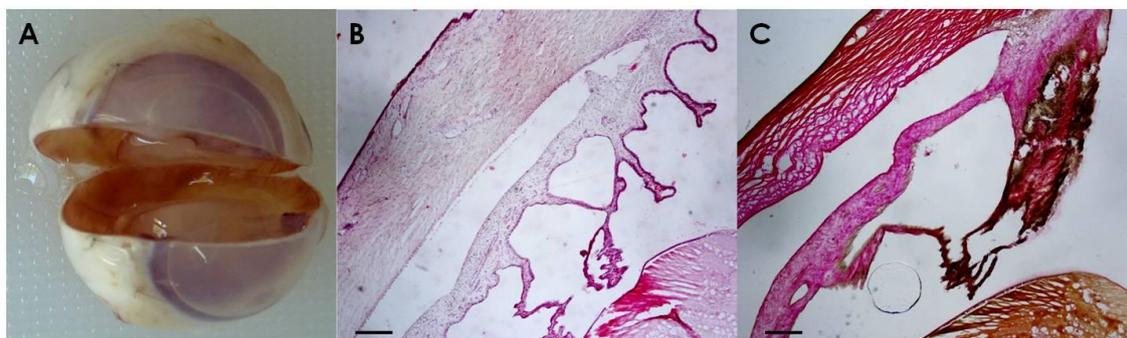


Figura 12. Análisis histológico. Sección del globo ocular según el protocolo de estudio **(A)**. Corte histológico del segmento anterior teñido con hematoxilina-eosina **(B)** y Verhoeff **(C)**. Barra = 100 µm.

9. GRUPOS DE ANIMALES

Se emplearon 42 conejos albinos distribuidos en los siguientes grupos:

9.1. Grupo 1: Compuesto por 6 ojos izquierdos de 6 conejos a los que se practicó una trabeculectomía con aplicación de MMC tópica.

9.2. Grupo 2: Formado por 6 ojos izquierdos de 6 conejos a los que se realizó una trabeculectomía con 5-FU tópico.

9.3. Grupo 3: Integrado por 6 ojos izquierdos de 6 conejos tratados mediante trabeculectomía con implante de PLGA sin carga farmacológica.

9.4. Grupo 4: Constituido por 6 ojos izquierdos correspondientes a 6 conejos intervenidos mediante trabeculectomía con implante de PLGA cargado con microesferas de MMC y recubierto con MMC.

9.5. Grupo 5: Formado por 6 ojos izquierdos de 6 conejos sometidos a trabeculectomía con implante de PLGA cargado con microesferas de MMC y recubierto con 5-FU.

9.6. Grupo 6: Compuesto por 6 ojos izquierdos de 6 conejos tratados mediante trabeculectomía e inyección subconjuntival de bevacizumab.

9.7. Grupo 7: Constituido por 6 ojos izquierdos correspondientes a 6 conejos a los que se realizó trabeculectomía con implante de PLGA cargado con microesferas de MMC e inyección subconjuntival de bevacizumab.

9.8. Grupo 8: Formado por 42 ojos derechos correspondientes a los 42 conejos de los grupos anteriores, tratados mediante trabeculectomía sin tratamiento coadyuvante.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los ensayos *in vitro* del estudio se realizó mediante el software Sigma Plot 8.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, Estados Unidos). El análisis estadístico de los ensayos *in vivo* de este estudio se llevó a cabo mediante el programa SPSS 17.0 (SPSS Sciences, Chicago, Illinois, Estados Unidos). El nivel de significación estadístico fue de $P < 0,05$. Se aplicaron los siguientes test estadísticos:

10.1. Análisis de regresión

Realización del ajuste de curvas dosis-respuesta de antimetabólicos, cálculo de la DL_{50} y realización de la recta patrón de MMC en el estudio de cinética de liberación de los implantes.

10.2. Test de Kolmogorov-Smirnov

Comprobación del ajuste de las variables a la distribución normal.

10.3. Test paramétricos

Empleados para variables que, como la PIO, siguieron una distribución normal.

- Test t de Student para muestras independientes: comparación de cada grupo con el grupo control.
- Test t de Student para muestras relacionadas: comparación de cada momento con el momento basal (evaluación del modelo experimental)
- Test ANOVA de medidas repetidas para comparaciones entre grupos.
- Test de contrastes *a posteriori* de Tukey para analizar la contribución de cada grupo en los resultados obtenidos en el ANOVA.
- Test ANOVA de una vía para comparación basal entre grupos

10.4. Test no paramétricos

Empleados para variables ordinales, como las de la ampolla

- Test U de Mann-Whitney para muestras independientes: comparación de cada grupo con el control.
- Test W de Wilcoxon para muestras relacionadas: comparación de cada momento con el basal (evaluación del modelo experimental).
- Prueba H de Kruskal-Wallis para análisis entre grupos de muestras independientes.

10.5. Test de correlación bivariada de Spearman

Análisis de correlación entre la PIO y las variables de la ampolla en cada momento de estudio y entre la PIO y la persistencia del implante al final del estudio.

10.6. Test de correlación de Pearson

Estudio de correlación de la PIO entre ambos ojos de cada conejo.

10.7. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier

- Elaboración de gráficas de supervivencia de la cirugía en función de la PIO (criterio de fracaso: recuperación de PIO basal \pm 1mmHg) y del área de ampolla (criterio de fracaso: desaparición de la ampolla: área de ampolla grado 1).
- Test Log-Rank: comparación entre las gráficas de supervivencia.

Resultados

1. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS ANTIMITÓTICOS

Las curvas dosis-respuesta fueron obtenidas tras la realización de los ensayos de citotoxicidad sobre las líneas celulares WKD y SIRC.

1.1. Dosis-respuesta de 5-Fluorouracilo

La mortalidad celular derivada del 5-FU en ambas líneas celulares viene representada en la figura 1.

1.1.1. Línea celular SIRC

La curva dosis respuesta obtenida tenía una morfología hiperbólica. Presentaba una fase inicial con un comportamiento lineal (hasta una dosis de 100 y 50 $\mu\text{g/ml}$ para los días 1 y 3 respectivamente) y una fase estacionaria asintótica respecto al eje de abscisas. Esta última fase indicaría el máximo efecto de muerte celular (E_{max}) inducido por el 5-FU sobre las células SIRC.

1.1.2. Línea celular WKD

En el primer tiempo de incubación, los resultados mostraron una curva hiperbólica, con una fase inicial creciente hasta una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ y una segunda fase asintótica al eje de abscisas que no llegó a alcanzar los 50% de la mortalidad, en las concentraciones del fármaco estudiadas. En cambio, en el día 3, el 5-FU no demostró citotoxicidad, exceptuando las dos últimas concentraciones evaluadas (2000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$).

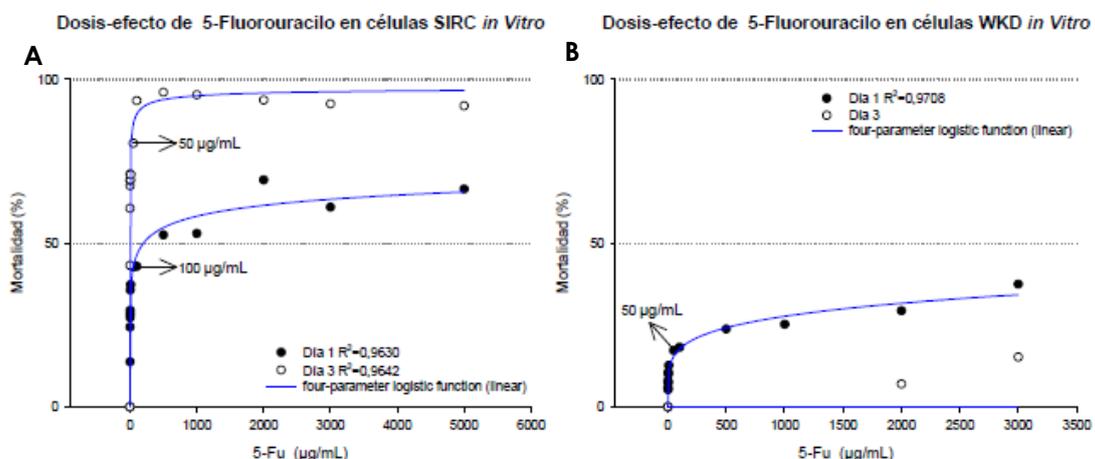


Figura 1. Representación gráfica de la curva dosis-respuesta al 5-FU provocada tras incubación de 1 y 3 días sobre las líneas celulares SIRC (A) y WKD (B).

Estos resultados demuestran que el 5-FU tiene un mayor efecto citotóxico sobre los fibroblastos (SIRC) que sobre el epitelio conjuntival (WKD), los cuales están más implicados en los procesos de cicatrización tras cirugía filtrante (Hitchings, et al., 1983, Jampel, et al., 1988) (tabla 1).

Tabla 1. Efecto del 5-FU sobre células SIRC y WKD

5-FU ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo de incubación	E max (% de mortalidad)	
		SIRC	WKD
3000	Día 1	66,5	37,5
	Día 3	92,6	22,9

1.2. Dosis-respuesta de mitomicina C

La mortalidad celular inducida por la MMC sobre ambas líneas celulares viene representada en la figura 2.

1.2.1. Línea celular SIRC

La curva de citotoxicidad describió un comportamiento lineal hasta la dosis de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ y 0,4 $\mu\text{g/ml}$ para los días 1 y 3 respectivamente. Posteriormente se desarrolló una fase estacionaria asintótica al eje de abscisas.

1.2.2. Línea celular WKD

En este caso, a diferencia de lo que ocurrió con el 5-FU, la MMC indujo un importante efecto citostático. La curva dosis-respuesta obtenida tenía una morfología hiperbólica, con comportamiento lineal hasta las concentraciones de 0,8 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para los días 1 y 3 respectivamente, para continuar con un comportamiento asintótico al eje de abscisas.

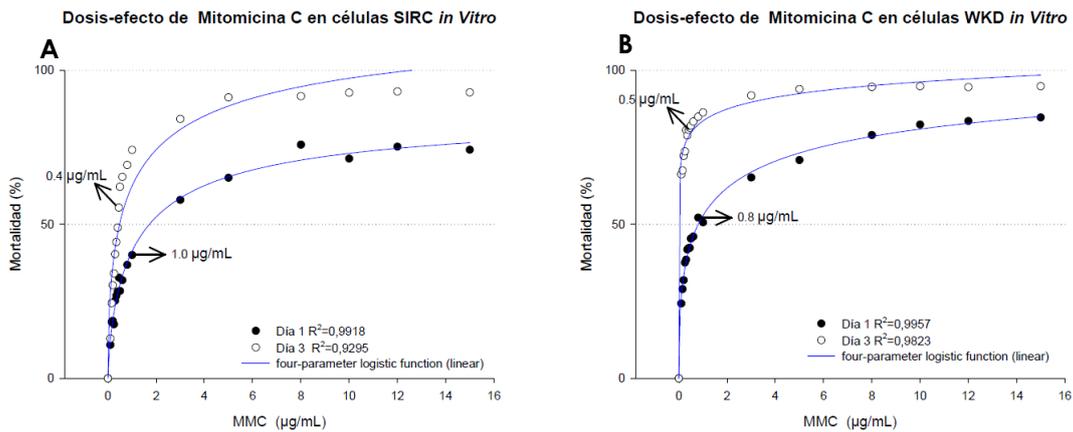


Figura 2. Representación gráfica de la curva dosis-respuesta a la MMC provocada tras incubación de 1 y 3 días sobre las líneas celulares SIRC (A) y WKD (B).

De estos resultados se desprende que la MMC afecta indistintamente a ambas líneas celulares, a diferencia del 5-FU, más efectivo sobre la línea celular SIRC. Asimismo, se trata de un efecto rápido, dado que desde el primer día se observaba una inducción de muerte celular superior al 50% a pesar de las bajas concentraciones del fármaco (tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la MMC sobre células SIRC y WKD

MMC (µg/ml)	Tiempo de incubación	E max (% de mortalidad)	
		SIRC	WKD
15	Día 1	74,2	84,7
	Día 3	92,8	94,8

Emax: efecto máximo

1.3. Eficacia del citostático

La eficacia de un fármaco (Emax) viene definida por la altura máxima de la curva dosis-respuesta representada en forma semilogarítmica.

1.3.1. Eficacia de 5-Fluorouracilo y mitomicina C sobre la línea SIRC

Según se desprende de la figura 3, en el día 1 no se pudo calcular la Emax, dado que con ninguno de los citostáticos evaluados se alcanzó el máximo en la curva sigmoidea dosis-respuesta. Sin embargo, en el día 3 se observó una línea asintótica a las abscisas, correspondiente a la eficacia máxima de ambos

fármacos. En este tiempo de incubación, la eficacia del 5-FU fue ligeramente superior a la de la MMC (Emax de 94,9% y 92,6% respectivamente), si bien la MMC requirió dosis más bajas para tal efecto, es decir, presentaba mayor potencia. En definitiva, ambos citostáticos presentaron una eficacia similar tras una exposición de 3 días al fármaco.

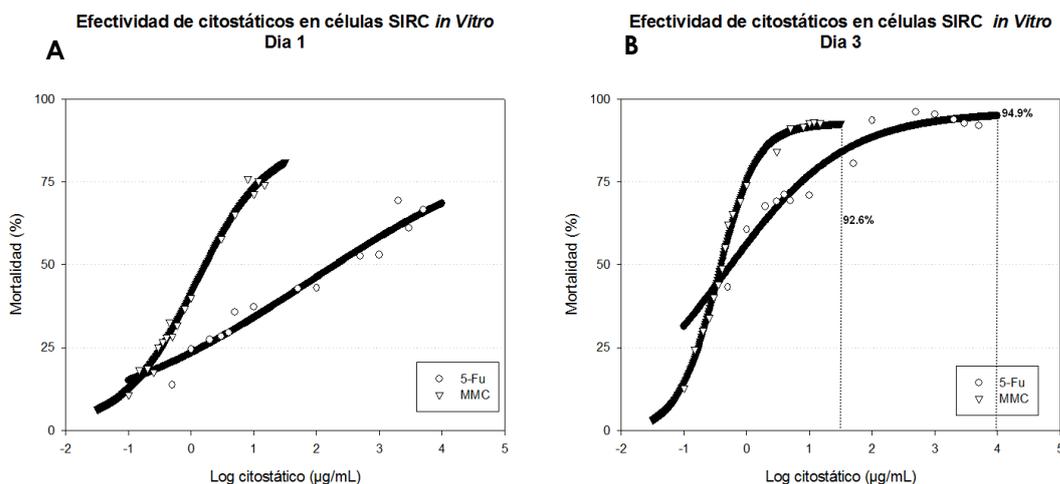


Figura 3. Representación gráfica de la curva semilogarítmica dosis-respuesta del 5-FU y MMC en el caso de las células SIRC. Incubación de un día (A) y tres días (B).

Tabla 3. Eficacia del 5-FU y MMC sobre las células SIRC

SIRC	5-FU		MMC	
	r ²	Emax (%)	r ²	Emax (%)
Día 1	0,9466	ND	0,9330	ND
Día 3	0,9415	94,9	0,9941	92,6

ND: no definida. r²: coeficiente de determinación.
Emax: efecto máximo

1.3.2. Eficacia de 5-Fluorouracilo y mitomicina C sobre la línea WKD

De forma análoga a lo que ocurrió sobre la línea SIRC, en el primer tiempo de incubación (día 1) no se pudo determinar la efectividad de ninguno de los fármacos. Sin embargo, en el día 3, la MMC presentaba una Emax de 94,8%, a diferencia del 5-FU, que continuaba sin ser eficaz sobre esta línea celular (figura 4, tabla 4). Curiosamente, el efecto citostático del 5-FU fue superior en

el día 1 que en el día 3. Este hecho probablemente se debió al consumo del fármaco en el primer tiempo de incubación.

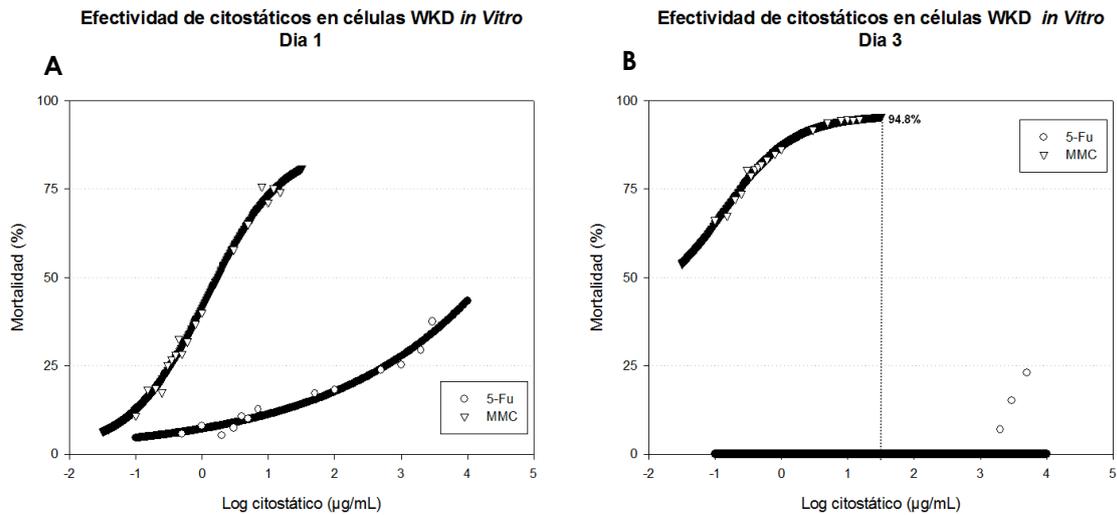


Figura 4. Representación gráfica de la curva semilogarítmica dosis-respuesta del 5-FU y MMC en el caso de las células WKD. Incubación de un día (A) y tres días (B).

Tabla 4. Eficacia del 5-FU y MMC sobre las células WKD

WKD	5-FU		MMC	
	r ²	E _{max} (%)	r ²	E _{max} (%)
Día 1	0,9649	ND	0,9907	ND
Día 3	ND	ND	0,9849	94,8

ND: no definida. r²: coeficiente de determinación.
E_{max}: efecto máximo

1.4. Potencia del citostático:

La potencia de un principio activo representa la velocidad con la que alcanza su efecto farmacológico. En nuestro caso viene representada por la dosis letal 50 (DL₅₀), dosis que provoca la muerte de la mitad de las células del cultivo. Dados los resultados obtenidos, la fórmula de cálculo de la DL₅₀ mediante análisis de regresión fue la siguiente:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(Log EC_{50} - x) m}}$$

max = porcentaje de mortalidad celular máximo
min = porcentaje de mortalidad celular mínimo
EC₅₀ = concentración efectiva 50 = DL₅₀
m = pendiente de la recta
x = concentración

1.4.1. DL₅₀ del 5-Fluorouracilo sobre las líneas SIRC y WKD

Tal como se ilustra en la figura 5 y tabla 5, en la línea celular SIRC, la DL₅₀ fue de 81,1 µg/ml en el día 1, y de 0,47 µg/ml en el día 3. En cambio, en el caso de la línea celular WKD, no fue posible determinar la DL₅₀ del 5-FU en ninguno de los tiempos de incubación evaluados. Al igual que en el apartado 1.1., el efecto citostático del 5-FU fue inferior sobre las células WKD que sobre las células SIRC.

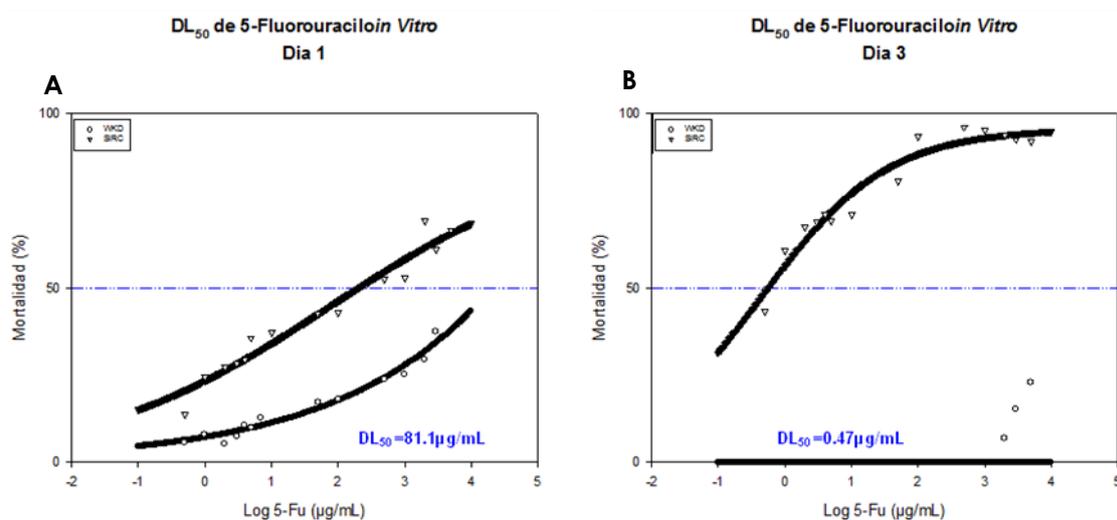


Figura 5. Representación gráfica de la curva semilogarítmica dosis-respuesta del 5-FU en las células WKD y SIRC. Incubación de un día (A) y tres días (B). Se resalta la DL₅₀ para las células SIRC

Tabla 5. DL₅₀ del 5-FU sobre las células SIRC y WKD en los días 1 y 3

5-FU	Día 1				Día 3			
	r ²	Pendiente	Log DL ₅₀	DL ₅₀	r ²	Pendiente	Log DL ₅₀	DL ₅₀
SIRC	0,9466	0,2389	1,9090	81,1	0,9415	0,4614	-0,3244	0,47
WKD	0,9649	0,1963	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: no definida. r²: coeficiente de determinación.

1.4.2. DL₅₀ de la mitomicina C sobre línea SIRC y WKD

La MMC presentó una importante actividad citostática sobre ambas líneas celulares, como se desprende de la figura 6. Tras una incubación de un día, el efecto citostático fue mayor sobre las células WKD (DL₅₀ de 1,3 µg/ml), que sobre las SIRC (DL₅₀ de 1,51 µg/ml), probablemente por la mayor capacidad proliferativa de estas últimas (tabla 6). Tras tres días de incubación se observó un incremento considerable de la toxicidad de la MMC sobre ambos tipos celulares. En el caso de la línea celular SIRC se evidenció un notable

incremento en la pendiente de la curva. Este incremento revela la proximidad entre la dosis terapéutica y dosis tóxica de este fármaco en esta línea celular. Sobre las células WKD, el fármaco se mostró altamente tóxico, induciendo una mortalidad superior al 50%, incluso a dosis bajas.

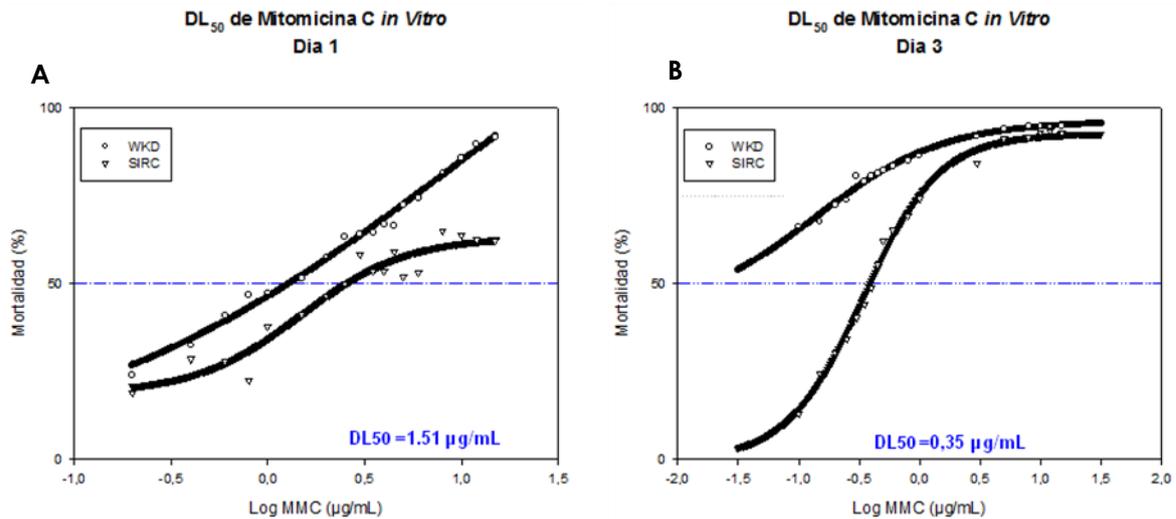


Figura 6. Representación gráfica de la curva semilogarítmica dosis-respuesta de la MMC en las células WKD y SIRC. Incubación de un día (A) y tres días (B). Se resalta la DL₅₀ para las células SIRC

Tabla 6. DL₅₀ de la MMC sobre las células SIRC y WKD en los días 1 y 3

MMC	Día 1				Día 3			
	r ²	Pendiente	Log DL ₅₀	DL ₅₀	r ²	Pendiente	Log DL ₅₀	DL ₅₀
SIRC	0,933	0,7573	0,1779	1,51	0,9941	1,3759	-0,4572	0,35
WKD	0,9892	0,4608	0,1142	1,3	0,9849	0,828	ND	ND

ND: no definida. r²: coeficiente de determinación. DL₅₀: dosis letal 50

De estos resultados se desprende que la MMC es más inespecífica, actuando de forma efectiva sobre ambas líneas celulares, principalmente WKD. En lo que respecta a potencia, la MMC es más potente que el 5-FU (53 veces más potente en células SIRC: 81,1/1,51 µg/ml). En la formulación del implante hemos empleado una concentración de MMC de 1,04 µg/ml, inferior a la DL₅₀ sobre ambos tipos celulares. Con ello conseguiríamos eficacia antiproliferativa sobre los fibroblastos, sin provocar un daño significativo sobre el epitelio conjuntival, en un periodo de liberación preestablecido de un mes.

En lo que respecta a la comparación entre líneas celulares, la línea SIRC parece más vulnerable al efecto citostático de ambos fármacos (mayores valores de pendiente de la curva).

1.5. Descripción microscópica de los cultivos celulares con mitomicina C

De forma adicional, se realizó un control microscópico de cada uno de los cultivos celulares expuestos a MMC.

Tras un periodo de incubación de un día en ausencia de MMC, los islotes celulares presentaron mayor tamaño en el caso de las células SIRC. Al incrementar la concentración de MMC hasta 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (DL_{50}), al cabo de 1 día, se observaba una reducción del tamaño de los islotes de células SIRC y WKD (reducción del 50% y 60,8% de la población celular respectivamente). Tras una incubación de 3 días, la reducción de la población celular fue más drástica (81% y 99% respectivamente). La dosis más elevada de MMC (15 $\mu\text{g/ml}$) evidenció ser letal sobre ambos tipos celulares independientemente del tiempo de incubación estudiado (figura 7).

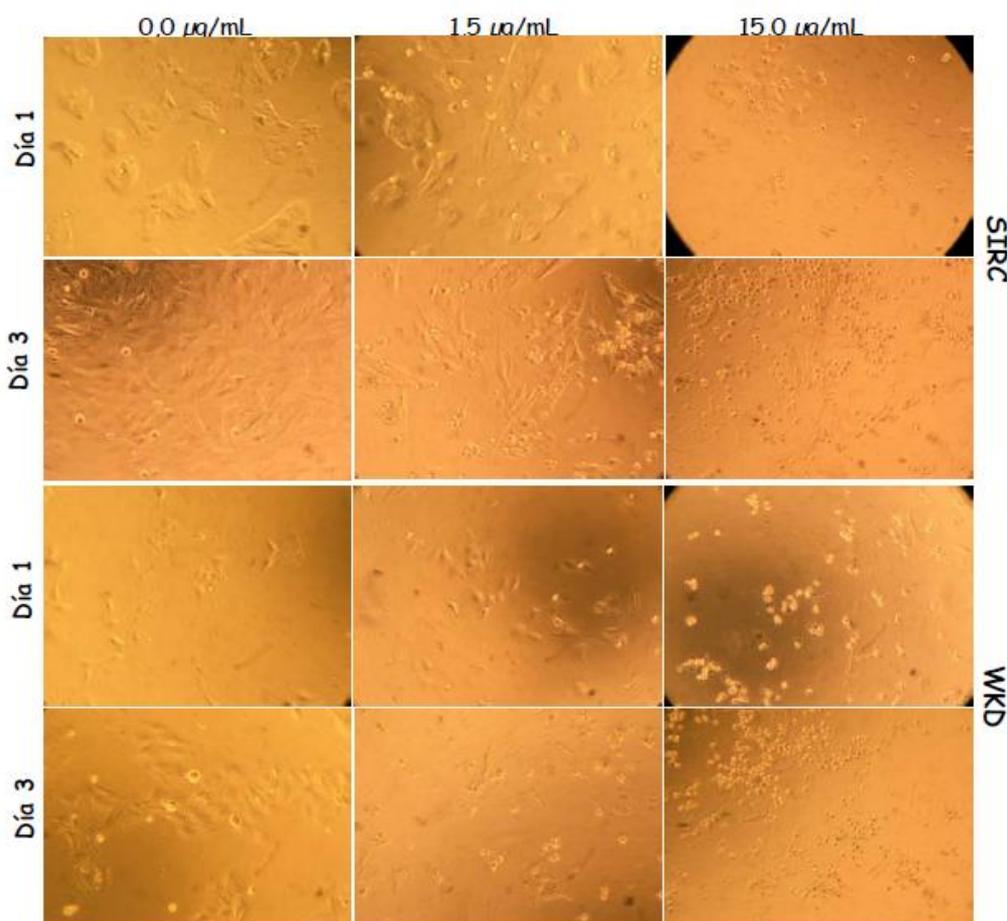


Figura 7. Microfotografía de cultivos celulares de células SIRC y WKD bajo concentraciones crecientes de MMC (0, 1,5 y 15 $\mu\text{g/ml}$), en dos tiempos de incubación (1 y 3 días). (10 x)

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS IN VITRO

Se llevó a cabo mediante microscopía óptica (control de calidad del proceso de elaboración), electrónica (SEM) y difracción láser.

2.1. Microscopía óptica

El análisis de cada lote permitió verificar la formación de micropartículas esféricas homogéneas, con un rango de tamaños de 20-30 μm (figura 8, A).

2.2. Microscopía electrónica de barrido

El examen con microscopio de barrido evidenció la formación de micropartículas esféricas de contorno liso (figura 8, B) que, al comenzar a degradarse, se hidrataron y adquirieron una morfología porosa (figura 8, C).

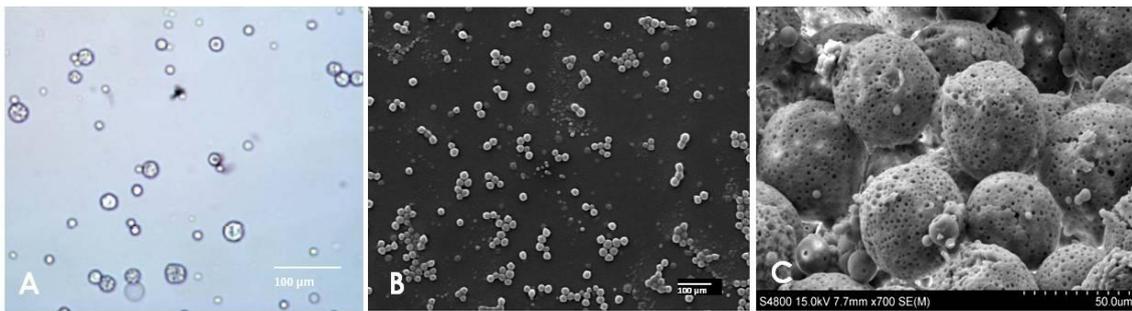


Figura 8. Caracterización morfológica de las microesferas. Homogeneidad de tamaños y contorno liso mediante microscopía óptica (A) y electrónica (B). Imagen de microscopía electrónica que muestra la formación de poros superficiales por degradación del PLGA.

2.3. Difracción láser

La distribución de tamaños de tres lotes de micropartículas (Bi027: micropartículas vacías; Bi030: micropartículas con MMC y recubiertas con MMC y Bi034: micropartículas con MMC) dio lugar a una distribución unimodal, con una moda en torno a 30-40 μm y un rango entre 3-60 μm (Tabla 7, Figura 9). El análisis de los histogramas obtenidos reveló una distribución homogénea en los tres lotes y un ligero desplazamiento hacia la derecha (mayor tamaño de micropartículas) en el caso del lote Bi030. Atendiendo a la distribución modal, se observó que el lote Bi027 estaba formado por partículas de menor diámetro. A la vista de los resultados, se infiere que la incorporación del citostático ocasiona un incremento en el tamaño de las micropartículas. Se

puede concluir que el método de elaboración de partículas es reproducible, con escasas modificaciones del tamaño de estas.

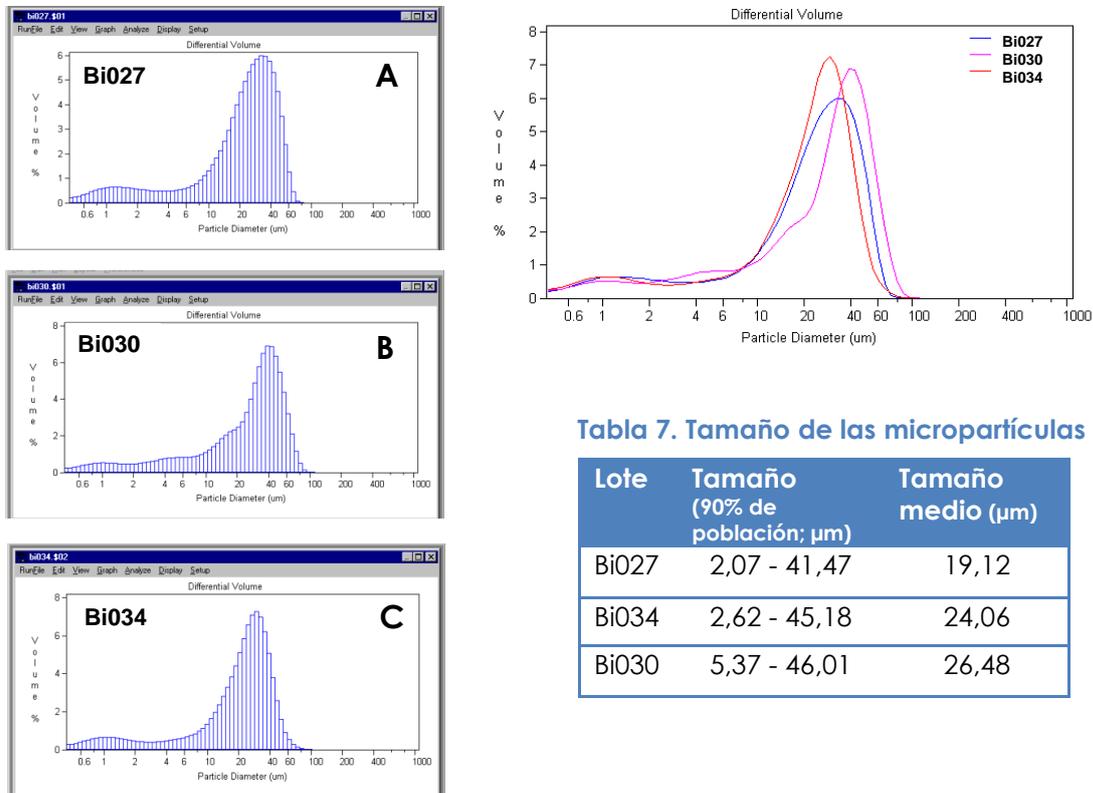


Tabla 7. Tamaño de las micropartículas

Lote	Tamaño (90% de población; μm)	Tamaño medio (μm)
Bi027	2,07 - 41,47	19,12
Bi034	2,62 - 45,18	24,06
Bi030	5,37 - 46,01	26,48

Figura 9. Distribución modal del tamaño de partícula en implantes vacíos (A), cargados y recubiertos con MMC (B) y cargados con MMC (C).

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS IMPLANTES IN VITRO

3.1. Control microbiológico

La esterilidad de los implantes fue comprobada tras el cultivo de los mismos (figura 10). Se evidenció la ausencia de crecimiento de microorganismos tras el mantenimiento del implante en suero fetal bovino.

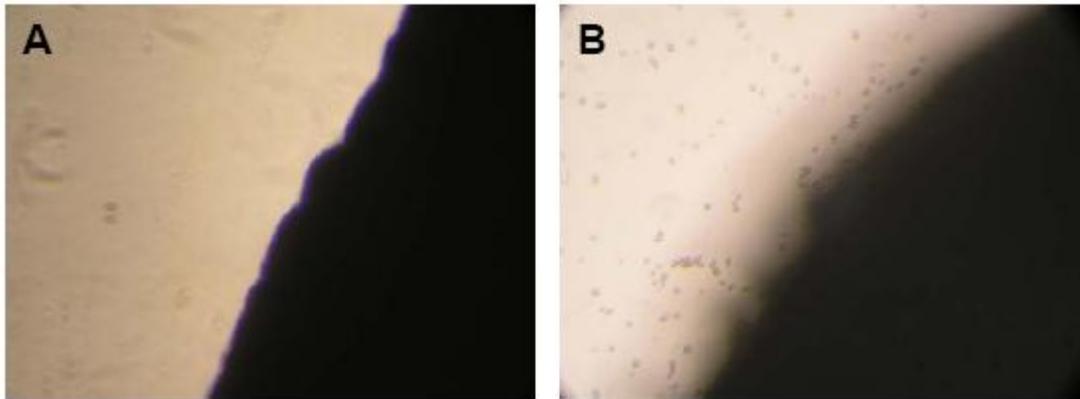


Figura 10. Fotografías del ensayo microbiológico. Implante vacío en tiempo inicial **(A)**. Implante vacío 8 días tras incubación en suero fetal bovino **(B)**.

3.2. Caracterización morfológica

El análisis con microscopía electrónica de barrido mostró una distribución homogénea de las micropartículas en el espesor del implante. En algunas zonas se apreciaban áreas de condensación que pensamos eran debidas a la entrada de agua en el implante por la humedad ambiental o bien al deterioro parcial del PLGA durante el proceso de esterilización (figura 11).

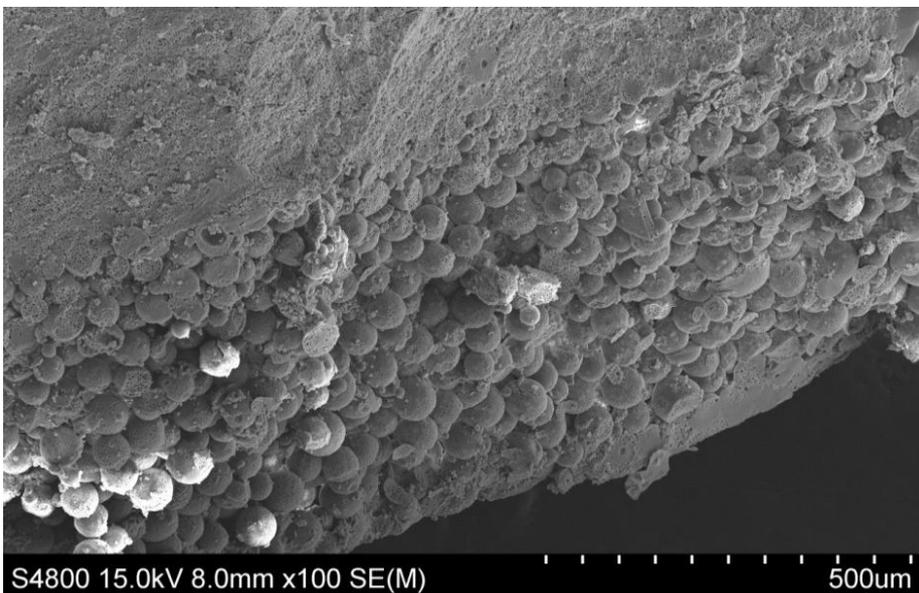


Figura 11. Fotografía de microscopía electrónica de barrido que muestra la acumulación de microesferas en el espesor del implante.

3.3. Estudio de citotoxicidad

El efecto de la MMC liberada por los implantes sobre ambas líneas celulares (SIRC y WKD) fue evaluado a partir de tres réplicas de implante cargados con MMC microencapsulada, con y sin recubrimiento de MMC.

Tras adicionar sobre la microplaca de cultivo el sobrenadante obtenido semanalmente por agitación orbital de los implantes, se evidenció un cambio de coloración del medio. Así, mientras los pocillos control preservaban el color rosa típico del medio, los pocillos correspondientes a los implantes evidenciaban un color amarillo, que viraba a rosa según avanzaban las semanas (hacia la derecha en la placa; figura 12). Este hecho se debe a la variación del pH del medio inducida por el PLGA, de forma que el rojo fenol (indicador del pH) vira desde el color rosa que presenta a pH de 7,4, a amarillo a pH 6,5, en presencia del polímero. El color amarillo se va perdiendo, adquiriendo nuevamente el color rosa, según se degrada el PLGA. Estos hallazgos se constataron independientemente de la carga y recubrimiento del implante.

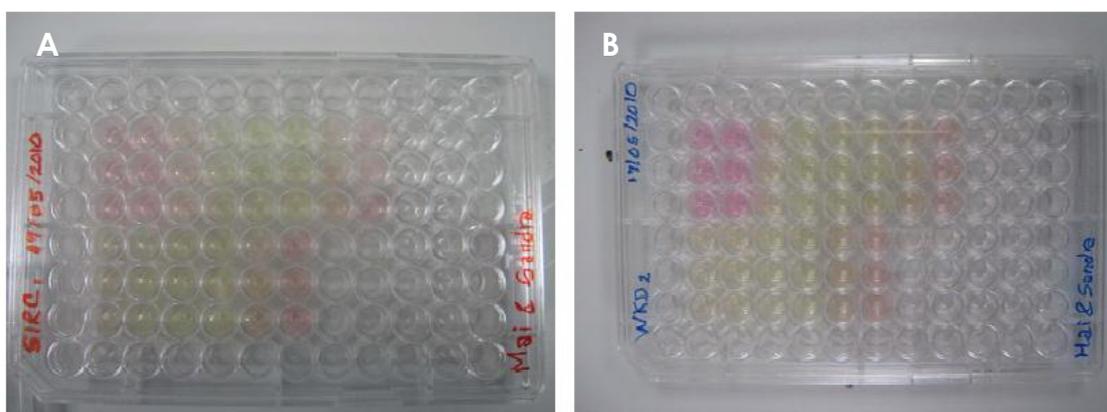


Figura 12. Microplacas con células SIRC (A) y WKD (B). Se observa el cambio de coloración inducido por el PLGA, así como por su degradación, según nos desplazamos hacia la derecha en la placa.

Transcurridas 24 horas de incubación, todos los pocillos presentaban la coloración rosa propia del cultivo en condiciones normales, análoga a la coloración de los pocillos control. Tras la adición del reactivo colorimétrico XTT, se evidenciaron dos hechos: la decoloración de los pocillos centrales en relación a los pocillos control, por efecto de la MMC liberada desde los

implantes y la recuperación de la coloración normal en el lado derecho de la placa, según aumentaba el número de células viables (figura 13). Una vez realizadas las lecturas fotométricas y normalizados los datos, los resultados fueron representados gráficamente (porcentaje de mortalidad celular en relación al tiempo, figura 14).

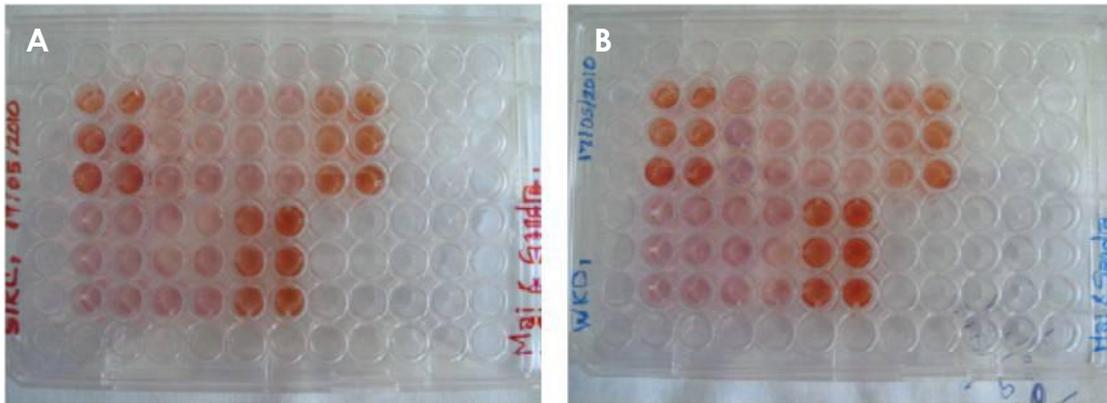


Figura 13. Microplacas con células SIRC (A) y WKD (B). Se observa la decoloración inducida por la MMC, así como la recuperación de la coloración normal, según nos desplazamos hacia la derecha en la placa, por el incremento en la viabilidad celular.

El perfil de actividad citostática de la MMC sobre las células SIRC, describió distintas fases (figura 14). En la fase inicial (primera semana) se indujo una muerte celular del 88%, posteriormente, en la fase sostenida (semanas 2-4) los niveles se mantuvieron en torno al 99% y finalmente (semanas 5 y 6) existió una reducción progresiva de la mortalidad de los fibroblastos, equivalente al 69,9 y 32,7% de su población respectivamente. Este descenso sería debido a la reducción progresiva del implante y al consumo de la MMC.

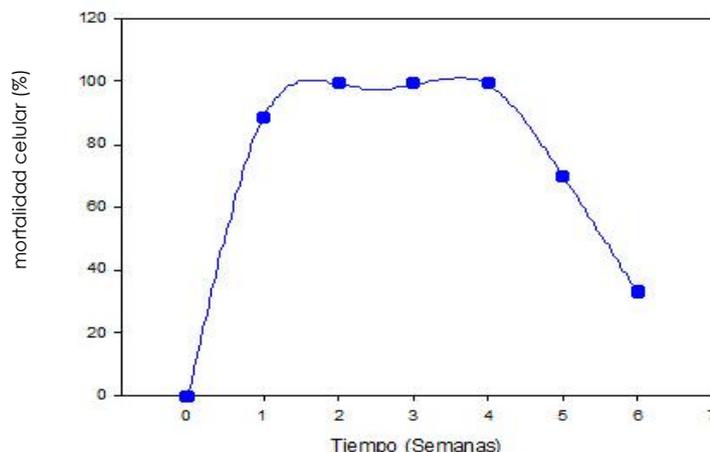


Figura 14: Actividad citostática de la MMC sobre las células SIRC.

En lo que respecta a la línea celular WKD, se observó un patrón de actividad citostática similar al de la línea SIRC (figura 15). Así, tras una fase inicial de incremento progresivo de la mortalidad celular (semana 1), se alcanzó un máximo que se mantuvo hasta la semana 4, a partir de la cual, cayó de forma progresiva (14,1% de mortalidad en la semana 6).

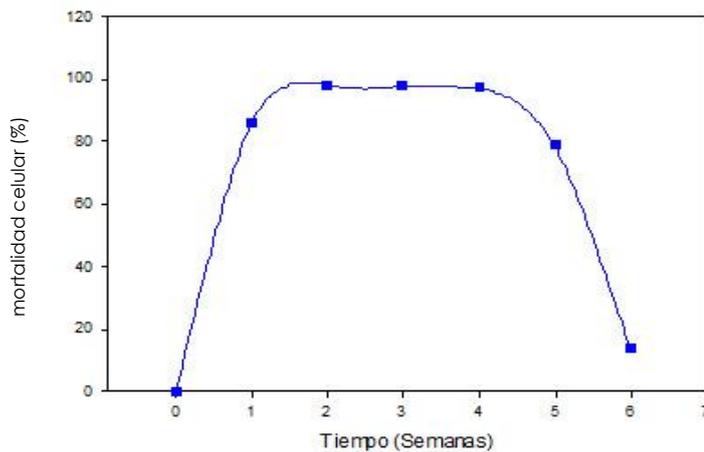


Figura 15. Actividad citostática de la MMC sobre las células WKD.

El examen microfotográfico de los cultivos celulares evidenció una acción similar de la MMC sobre ambos tipos celulares. Así, se observó una disminución progresiva del tamaño y densidad celular, principalmente entre las semanas 2 y 4 (figura 16). Esta disminución de tamaño sería debida a la apoptosis celular provocada por la MMC, dada su acción sobre el ADN celular. A partir de la cuarta semana, las células se recuperarían por consumo del antimetabólico.

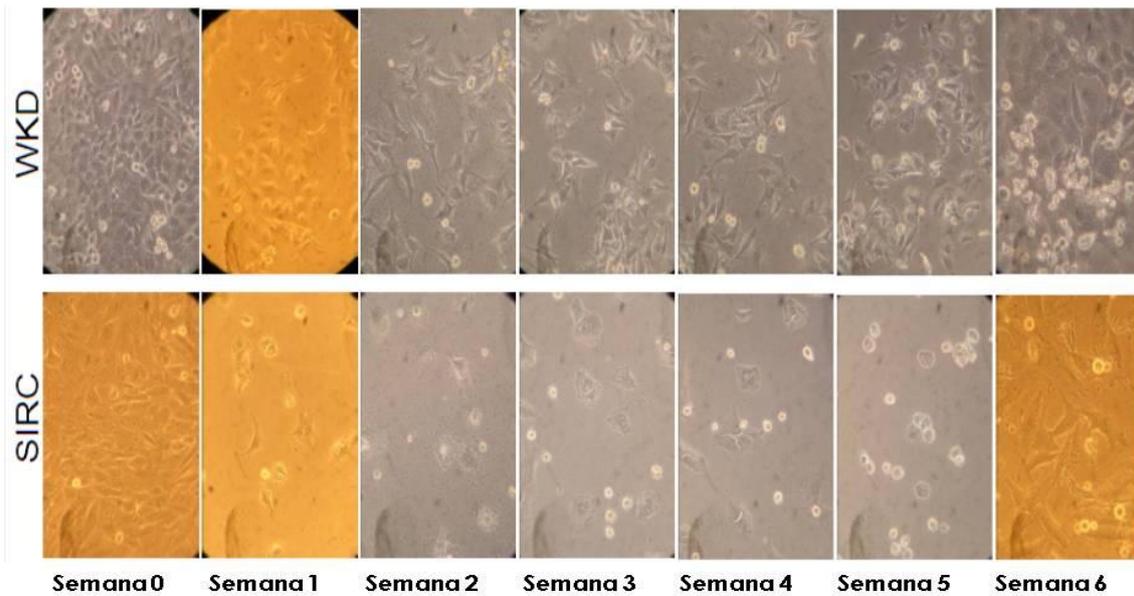


Figura 16. Microfotografía de cultivos celulares de células SIRC y WKD bajo la acción de la MMC obtenida semanalmente a partir de los implantes

3.4. Estudio de liberación del principio activo

La determinación cuantitativa de la liberación de MMC se basó en el conocimiento previo del efecto de concentraciones conocidas de MMC sobre cultivos de fibroblastos (SIRC). El efecto citostático se tradujo, previa lectura espectrofotométrica y normalizado de los datos, en el trazado de una recta patrón. Con esta finalidad, los valores fueron ajustados a la ecuación de la curva hiperbólica (figura 17).

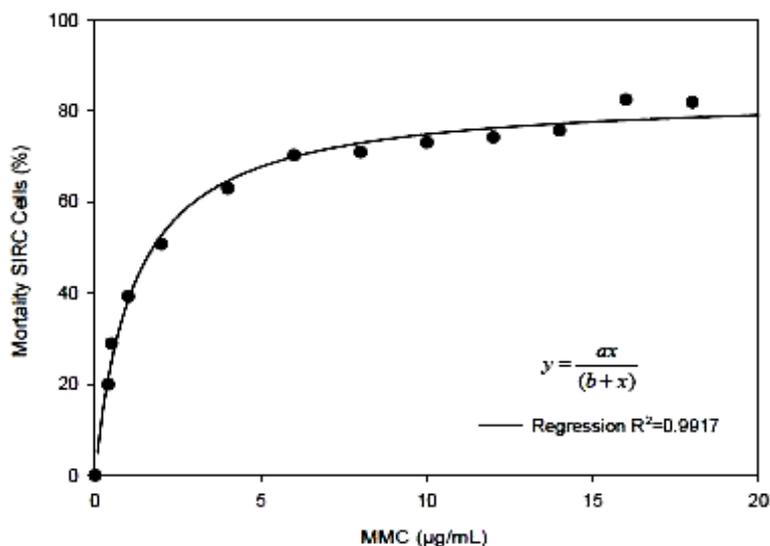


Figura 17. Recta patrón de la MMC sobre cultivo de células SIRC. Ecuación de la curva.

Los resultados mostraron que las concentraciones de MMC inferiores a 0,4 $\mu\text{g/ml}$ no eran cuantificables mediante este método. Asimismo se comprobó que la curva de calibración cuando alcanzaba niveles de mortalidad celular superiores al 70%, adquiría un comportamiento asintótico con respecto al eje de abscisas. Este hecho probablemente se debía, bien a la saturación del filtro o bien a la existencia de una acción antimetabólica tan intensa que no permitía una clara cuantificación a este nivel. Por ello, en las muestras con mortalidades superiores al 70%, fue necesaria la realización de diluciones que permitieron interpolar el porcentaje de mortalidad celular, a fin de obtener una calibración más precisa.

Posteriormente los sobrenadantes obtenidos semanalmente a partir de los implantes fueron adicionados a cultivos celulares de fibroblastos. Una vez realizadas las lecturas espectrofotométricas, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad celular, los cuales fueron transferidos a la recta patrón, infiriéndose las concentraciones correspondientes de MMC. Este ensayo se realizó con implantes con MMC encapsulada (Bi034) y con MMC encapsulada y en el recubrimiento (Bi030) (figura 18).

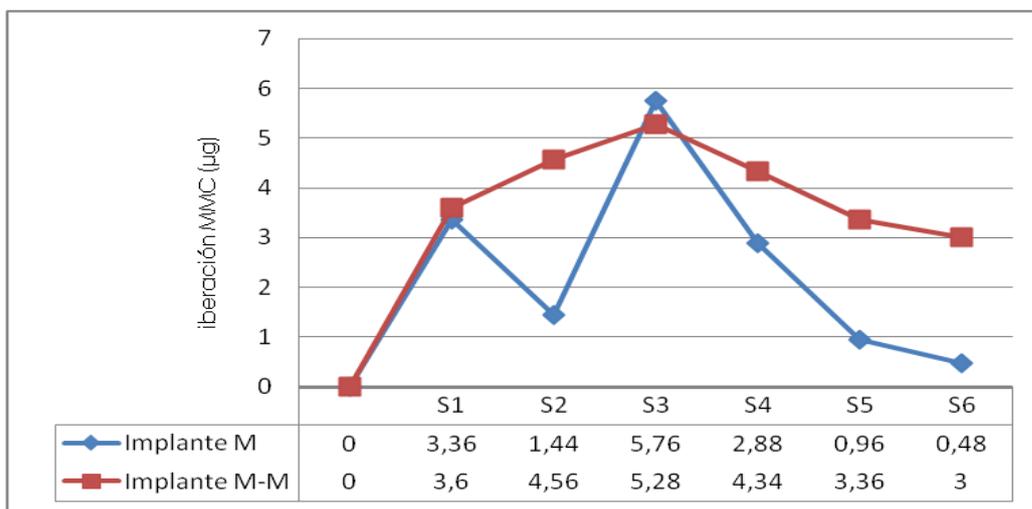


Figura 18. Curva concentración-tiempo de MMC liberada desde implantes con MMC encapsulada (**M**) y MMC encapsulada y en su recubrimiento (**M-M**) durante 6 semanas (S1-S6). Los valores de la tabla corresponden a la cantidad de MMC liberada por semana (μg).

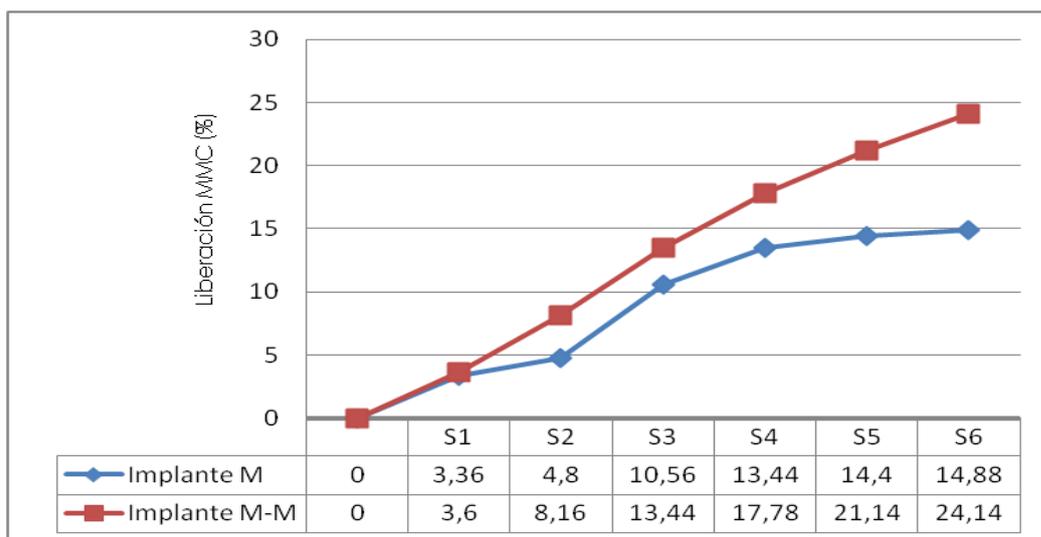


Figura 19. Patrón de liberación de MMC acumulado, a partir de dos tipos de implante: MMC encapsulada (**M**) y MMC encapsulada y en su recubrimiento (**M-M**). Los valores de la tabla corresponden a la cantidad de MMC liberada por semana (μg).

Los perfiles de liberación *in vitro* de MMC obtenidos en este estudio reflejaron diferencias en la liberación de la MMC a partir de ambos prototipos de implantes (figuras 18 y 19). El implante con MMC encapsulada presentó dos picos de liberación de MMC (semanas 1 y 3) y una liberación decreciente del fármaco a partir de dicho momento. En cambio, el implante recubierto, evidenció un perfil más uniforme, manteniéndose el pico máximo de liberación en la tercera semana. La mayor cantidad de citostático liberada por el segundo tipo de implante probablemente se debió al recubrimiento del mismo. La única excepción se encontró en la semana 3, momento en que la liberación desde ambos tipos de implante se igualaba a pesar del recubrimiento (Figura 18). En el gráfico de liberación acumulada de MMC se observa que el implante con recubrimiento de MMC presentó una cinética de orden 0, con un patrón de liberación constante a lo largo de las 6 semanas del estudio. El implante no recubierto mostró una cinética pseudo orden 0, próxima al implante anterior, pero con una menor tasa de liberación, probablemente por la ausencia de recubrimiento (figura 19).

3.5. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación de MMC fue calculada a partir de los niveles de MMC liberados en relación a la cantidad teórica de MMC de cada implante (ver apartado 4.4 de material y métodos). Fue estudiada en los mismos lotes de implantes del apartado anterior (Bi030 y Bi034), y se expone en la tabla 8.

Se observa que la eficiencia de encapsulación de ambos tipos de implante fue aceptable, siendo superior en el caso de implantes cargados y recubiertos con MMC que en el caso de los implantes únicamente cargados con el citostático. Teniendo en cuenta los resultados del apartado anterior, es probable que la mayor tasa de liberación fuera debida a una mayor tasa de encapsulación previa de la MMC.

Tabla 8. Liberación de MMC a partir de dos lotes de implantes y eficiencia de encapsulación

Semanas	Lote Bi030	Lote Bi034
1	3,6	3,36
2	4,56	1,44
3	5,28	5,76
4	4,34	2,88
5	3,36	0,96
6	3	0,48
Σ MMC	24,14	14,88
Carga teórica (μg)	37,5	31,25
	(31,25 + 6,25)	
EE	64,3%	47,6%

EE = Eficiencia de encapsulación (%)

4. EVALUACIÓN CLÍNICA

4.1. Presión intraocular

4.1.1. Evaluación del modelo experimental

Los valores de la PIO del grupo control a lo largo del estudio se representan en la figura 20 y tabla 9. Tras un descenso inicial de la misma, se observó una recuperación progresiva de sus valores basales. Para evaluar el modelo experimental desde el punto de vista de la PIO, se analizó la evolución de ésta en los ojos control en comparación con la situación basal. Esta comparación se realizó mediante tests paramétricos, una vez demostrada la normalidad de las variables ($P > 0,05$ en todas ellas). Se observó una reducción de la PIO respecto sus valores preoperatorios en todos los puntos del estudio a excepción del día 14, siendo esta reducción estadísticamente significativa al cabo de 0, 1, 5 y 7 días de la TBCT ($P < 0,01$).

El análisis de la supervivencia de la cirugía, definiendo el fracaso de la misma como la recuperación de la PIO preoperatoria ± 1 mmHg, dio lugar a una supervivencia quirúrgica media de 11,9 días (figura 22, tabla 10).

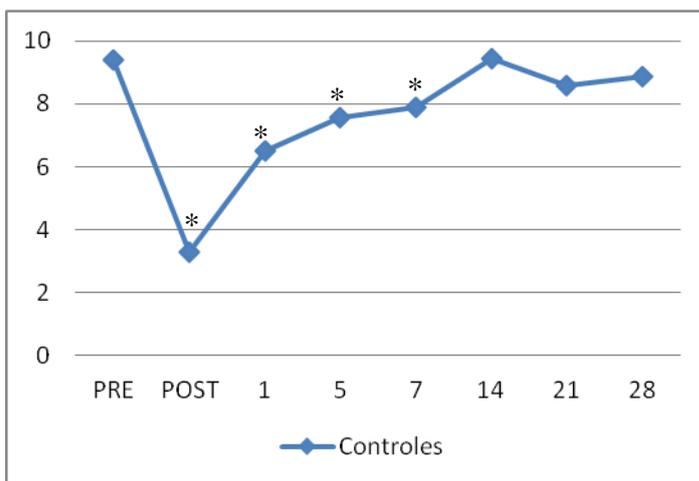


Figura 20. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días), en el grupo control. * Diferencias estadísticas significativas respecto al basal

Tabla 9. Valores de PIO en grupo control

Controles	n	Media	D.Estándar
PRE	41	9,39	1,61
POST	41	3,29	4,07
1	41	6,49	2,73
5	41	7,56	1,32
7	41	7,88	1,93
14	41	9,44	2,05
21	41	8,59	2,11
28	41	8,86	1,49

4.1.2. Evaluación de los tratamientos coadyuvantes

Previamente a la realización de comparaciones entre grupos, se constató la ausencia de diferencias entre ellos en cuanto a la PIO preoperatoria ($P = 0,597$; DNS). Para estudiar la utilidad hipotensora de cada tratamiento, se analizó la evolución de la PIO en cada uno de los grupos definidos en el apartado material y métodos (figura 21). A fin de realizar comparaciones estadísticas con el grupo control se constató previamente el ajuste de todas las variables a la distribución normal ($P > 0,05$ en todas las variables; DNS).

El análisis mediante el método Kaplan-Meier permitió evaluar la supervivencia de la cirugía en cada grupo a lo largo del estudio (figura 22), así como la supervivencia media en cada grupo (tabla 10).

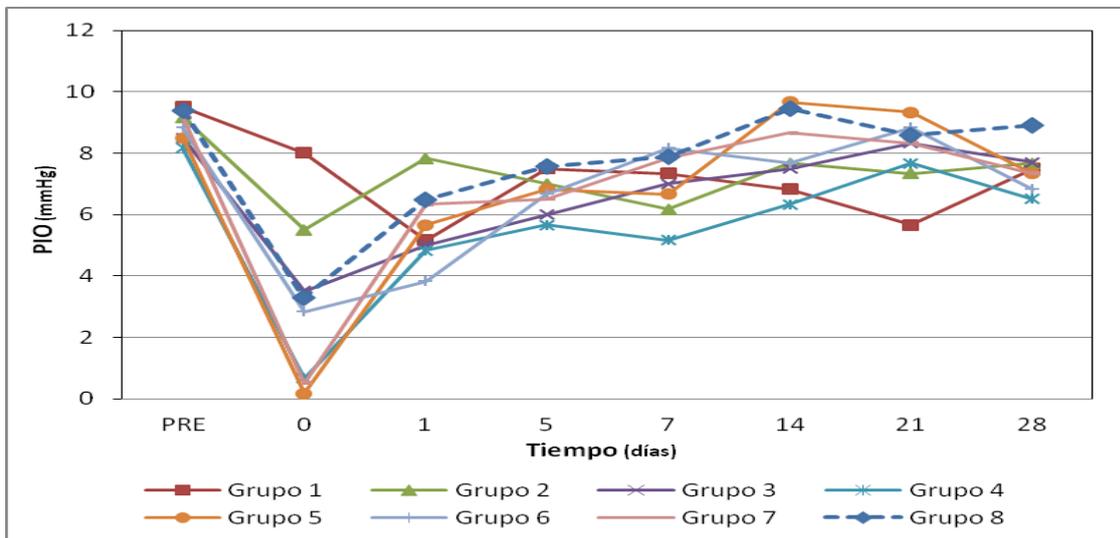


Figura 21. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días) en todos los grupos de estudio.

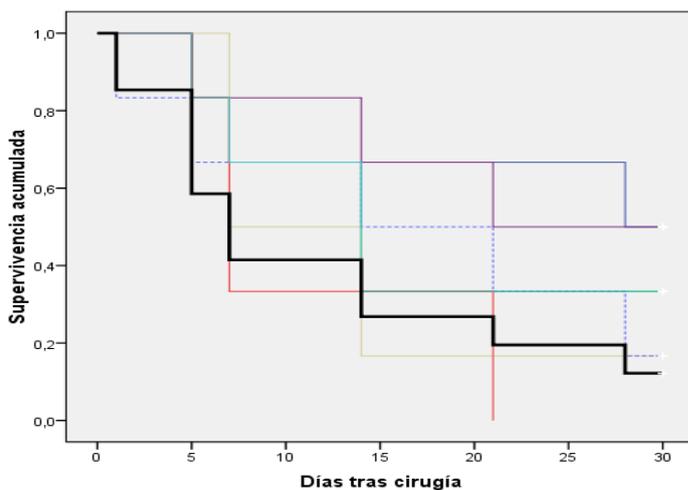


Tabla 10. Supervivencia quirúrgica por grupos.

GRUPO	Superv. media
1	21,6
2	16,6
3	13,1
4	22
5	16,5
6	11,3
7	16,6
8	11,9

Figura 22. Análisis de supervivencia en función de la PIO mediante el método de Kaplan-Meier.

- **Grupo 1: MMC tópica**

La aplicación tópica de MMC mejoró los resultados de la TBCT experimental a lo largo de todo el seguimiento, y especialmente al cabo de 14 y 21 días de la cirugía ($P = 0,006$ y $P = 0,005$ respectivamente; figura 23, tablas 11 y 12). Paradójicamente, las cifras tensionales se incrementaron significativamente en el postoperatorio inmediato ($P = 0,016$). La supervivencia media de la cirugía en este grupo fue de 21,6 días, frente a 11,9 días en el grupo control (tabla 10).

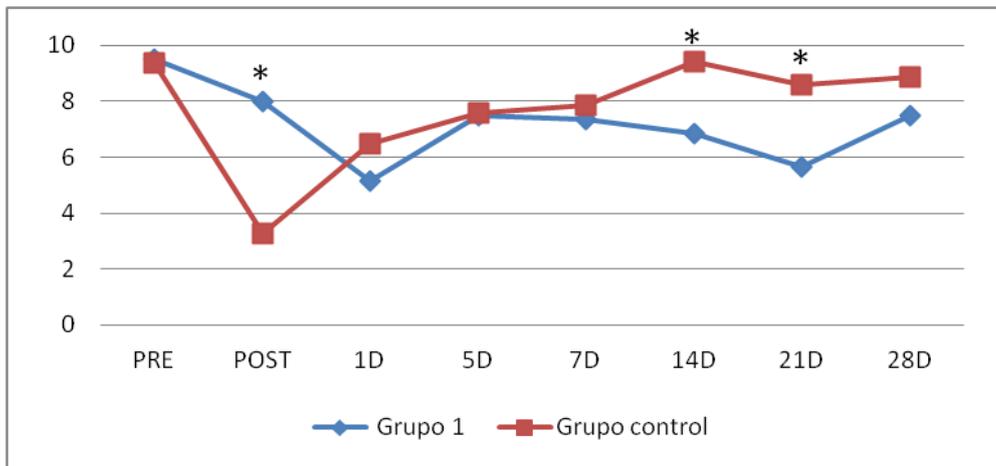


Figura 23. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días) en el grupo 1.
* Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 11. Valores postoperatorios de PIO (grupo control).

	n	Media	D.Estándar
CONTROL			
PRE	41	9,39	1,61
POST	41	3,29	4,07
1	41	6,49	2,73
5	41	7,56	1,32
7	41	7,88	1,93
14	41	9,44	2,05
21	41	8,59	2,11
28	41	8,86	1,49

Tabla 12. Valores postoperatorios de PIO (grupo MMC tópica).

	n	Media	D.Estándar
GRUPO 1			
PRE	6	9,50	1,87
POST	6	8,00	5,72
1	6	5,17	2,04
5	6	7,50	1,51
7	6	7,33	1,75
14	6	6,83	2,31
21	6	5,67	3,32
28	6	7,50	2,58

• Grupo 2: 5-FU tópico

La administración tópica de 5-FU afectó a la PIO de forma similar a la MMC, obteniéndose una reducción más significativa al cabo de 7 (P = 0,03) y 14 días (P = 0,049). Dicha reducción se mantuvo hasta el final del estudio (figura 24, tablas 13 y 14). La única diferencia con la MMC se detectó al cabo de un día, momento en el que la PIO con 5-FU era superior a la de los controles. La supervivencia media de la cirugía en este grupo fue de 16,6 días, superior a la del grupo control (11,9 días), pero inferior a la de la MMC tópica (21,6 días) (tabla 10).

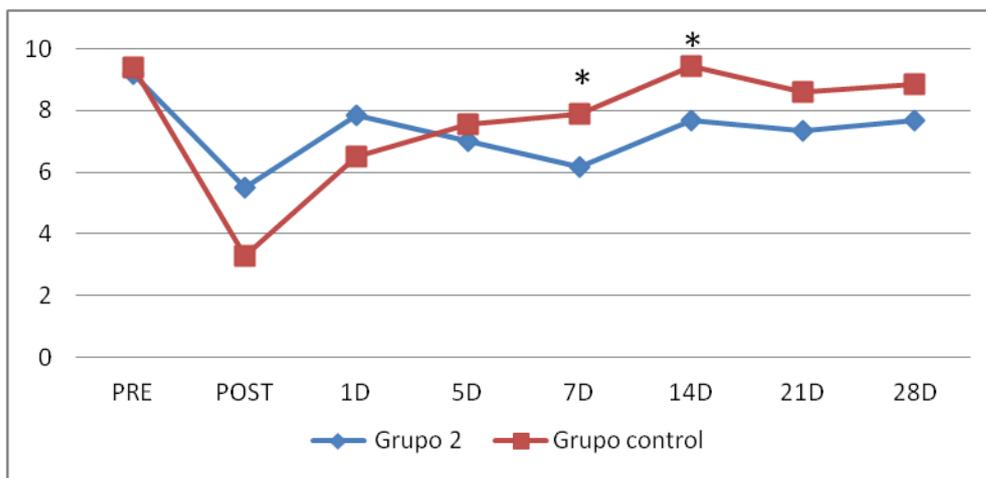


Figura 24. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días) en el grupo 2.
* Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 13. Valores postoperatorios de PIO (grupo control).

	n	Media	D.Estándar
CONTROL			
PRE	41	9,39	1,61
POST	41	3,29	4,07
1	41	6,49	2,73
5	41	7,56	1,32
7	41	7,88	1,93
14	41	9,44	2,05
21	41	8,59	2,11
28	41	8,86	1,49

Tabla 14. Valores postoperatorios de PIO (grupo 5-FU tópico).

	n	Media	D.Estándar
GRUPO 2			
PRE	6	9,17	1,47
POST	6	5,50	5,28
1	6	7,83	1,94
5	6	7,00	1,54
7	6	6,17	0,75
14	6	7,67	1,63
21	6	7,33	2,33
28	6	7,67	1,86

• Grupo 3: Implante

El empleo del implante vacío redujo los valores de PIO al cabo de 1, 5, 7 y 14 días respecto al grupo control, siendo esta reducción estadísticamente significativa a los 5 y 14 días tras cirugía ($P = 0,012$ y $0,029$) (figura 25, tablas 15 y 16). En los restantes momentos del estudio los controles nunca presentaron una PIO inferior a la de los conejos con implante. La supervivencia media de la cirugía en este grupo fue similar a la del grupo control (13,1 frente a 11,9 días) (tabla 10). Estos resultados demuestran la existencia de un efecto hipotensor aislado, debido al efecto espaciador del implante.

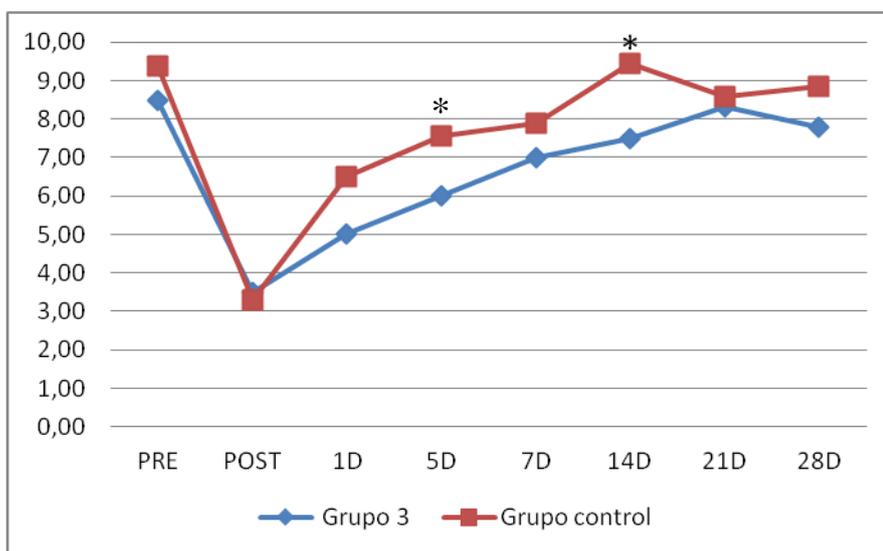


Figura 25. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días) en el grupo 3. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 15. Valores postoperatorios de PIO (grupo control).

	n	Media	D.Estándar
CONTROL			
PRE	41	9,39	1,61
POST	41	3,29	4,07
1	41	6,49	2,73
5	41	7,56	1,32
7	41	7,88	1,93
14	41	9,44	2,05
21	41	8,59	2,11
28	41	8,86	1,49

Tabla 16. Valores postoperatorios de PIO (grupo implante).

	n	Media	D.Estándar
GRUPO 3			
PRE	6	8,50	1,76
POST	6	3,50	4,72
1	6	5,00	1,41
5	6	6,00	1,67
7	6	7,00	1,26
14	6	7,50	1,04
21	6	8,33	2,73
28	6	8,50	1,76

• **Grupo 4: Implante con microesferas de MMC recubierto con MMC**

En comparación con el grupo control, el uso de implantes cargados con MMC permitió reducir la PIO en todos los momentos del estudio y, de forma significativa, al cabo de 5 (P = 0,002), 7 (P = 0,004), 14 días (P = 0,001) y 28 días (P = 0,001) (figura 26, tablas 17 y 18). Este grupo permitió alcanzar los mejores resultados en cuanto a supervivencia de la cirugía (22 días) (tabla 10).

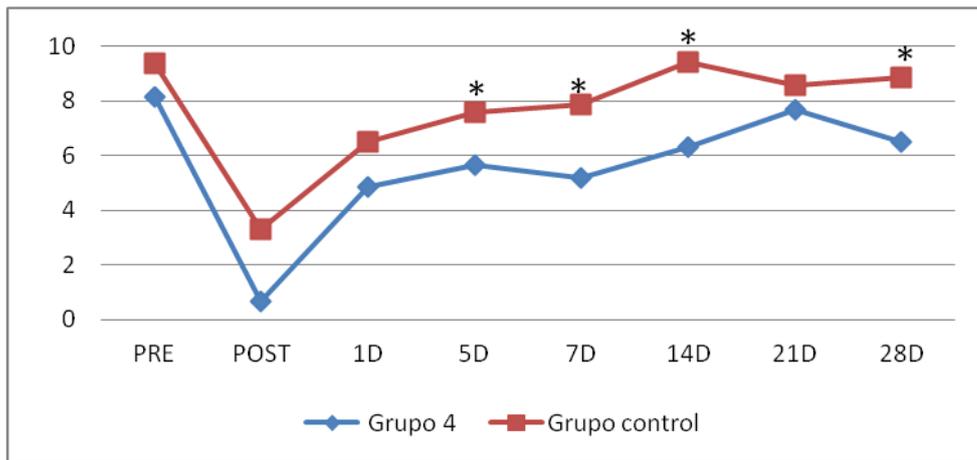


Figura 26. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días) en el grupo 4.
* Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 17. Valores postoperatorios de PIO (grupo control).

	n	Media	D.Estándar
CONTROL			
PRE	41	9,39	1,61
POST	41	3,29	4,07
1	41	6,49	2,73
5	41	7,56	1,32
7	41	7,88	1,93
14	41	9,44	2,05
21	41	8,59	2,11
28	41	8,86	1,49

Tabla 18. Valores postoperatorios de PIO (grupo implante MMC + MMC).

	n	Media	D.Estándar
GRUPO 4			
PRE	6	8,17	1,60
POST	6	0,67	1,63
1	6	4,83	1,72
5	6	5,67	1,36
7	6	5,17	2,92
14	6	6,33	2,25
21	6	7,67	1,75
28	6	6,50	1,64

- **Grupo 5: Implante con microesferas de MMC recubierto con 5-FU**

La utilización de implantes provistos de ambos antimetabólicos proporcionó unas cifras tensionales inferiores a las de los controles a lo largo de todo el estudio y, de una forma estadísticamente significativa, al cabo de 28 días ($P = 0,027$) (figura 27, tablas 19 y 20). La supervivencia media de la cirugía en este grupo fue de 16,5 días, superior a la del grupo control (tabla 10).

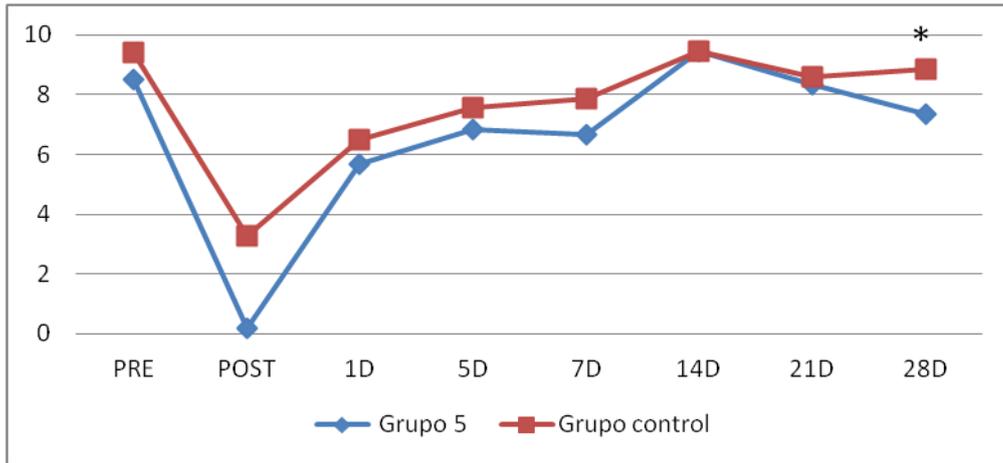


Figura 27. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días) en el grupo 5.

* Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 19. Valores postoperatorios de PIO (grupo control).

	n	Media	D.Estándar
CONTROL			
PRE	41	9,39	1,61
POST	41	3,29	4,07
1	41	6,49	2,73
5	41	7,56	1,32
7	41	7,88	1,93
14	41	9,44	2,05
21	41	8,59	2,11
28	41	8,86	1,49

Tabla 20. Valores postoperatorios de PIO (grupo implante MMC + 5-FU).

	n	Media	D.Estándar
GRUPO 5			
PRE	6	8,50	0,83
POST	6	0,17	0,40
1	6	5,67	2,16
5	6	6,83	1,94
7	6	6,67	2,06
14	6	9,67	2,58
21	6	8,33	3,38
28	6	7,33	1,50

• Grupo 6: Bevacizumab subconjuntival

El tratamiento coadyuvante con bevacizumab redujo la PIO al cabo de 1, 5, 14 y 28 días de la cirugía, siendo esta reducción estadísticamente significativa al cabo de 1 ($P = 0,03$), 14 ($P = 0,049$) y 28 días ($P = 0,004$) (figura 28, tablas 21 y 22). A pesar de estas cifras, la supervivencia media de la cirugía en este grupo fue inferior a la del grupo control (11,3 días frente a 11,9 días) (tabla 10).

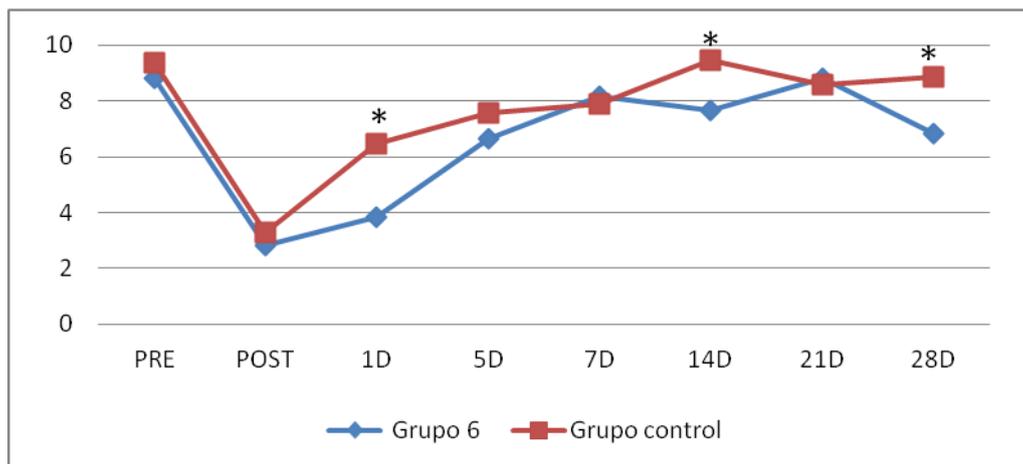


Figura 28. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días) en el grupo 6.
* Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 21. Valores postoperatorios de PIO (grupo control).

	n	Media	D.Estándar
CONTROL			
PRE	41	9,39	1,61
POST	41	3,29	4,07
1	41	6,49	2,73
5	41	7,56	1,32
7	41	7,88	1,93
14	41	9,44	2,05
21	41	8,59	2,11
28	41	8,86	1,49

Tabla 22. Valores postoperatorios de PIO (grupo bevacizumab).

	n	Media	D.Estándar
GRUPO 6			
PRE	6	8,83	0,98
POST	6	2,83	4,75
1	6	3,83	2,48
5	6	6,67	0,82
7	6	8,17	1,47
14	6	7,67	1,63
21	6	8,83	0,41
28	6	6,83	1,47

- **Grupo 7: Implantes con MMC y bevacizumab subconjuntival**

El empleo concomitante de implantes cargados con microesferas de MMC y bevacizumab subconjuntival redujo la PIO a lo largo de todo el seguimiento, haciéndolo de forma estadísticamente significativa únicamente al cabo de 28 días ($P = 0,032$), de forma similar a lo que ocurrió con el grupo 5 (figura 29, tablas 23 y 24). La supervivencia media de la intervención en este grupo fue de 16,6 días, frente a los 11,9 días del grupo control (tabla 10).

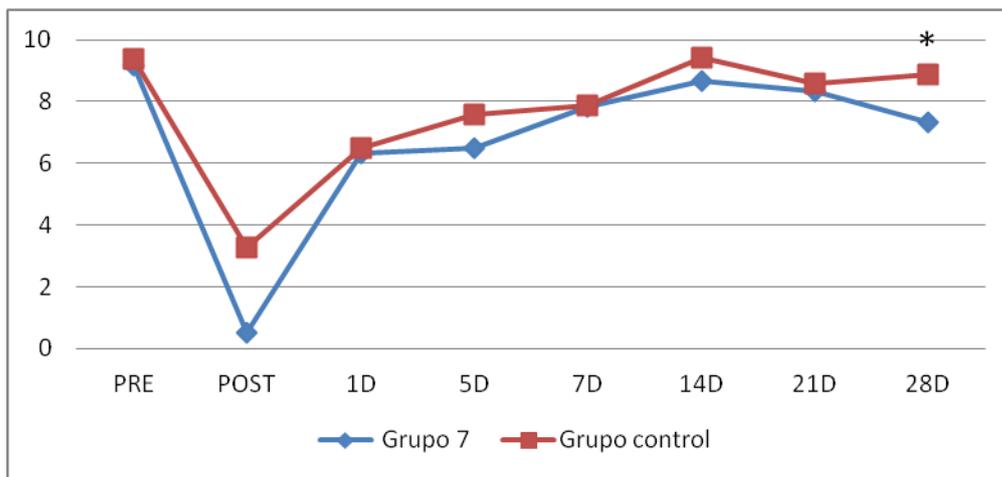


Figura 29. Evolución de la PIO media (mmHg) a lo largo del tiempo (días) en el grupo 7.
* Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 23. Valores postoperatorios de PIO (grupo control).

	n	Media	D.Estándar
CONTROL			
PRE	41	9,39	1,61
POST	41	3,29	4,07
1	41	6,49	2,73
5	41	7,56	1,32
7	41	7,88	1,93
14	41	9,44	2,05
21	41	8,59	2,11
28	41	8,86	1,49

Tabla 24. Valores postoperatorios de PIO (grupo MMC + Bevacizumab).

	n	Media	D.Estándar
GRUPO 7			
PRE	6	9,17	2,31
POST	6	0,50	0,83
1	6	6,33	1,86
5	6	6,50	2,07
7	6	7,83	2,63
14	6	8,67	1,21
21	6	8,33	1,36
28	6	7,33	1,86

4.1.3. Comparación entre tratamientos coadyuvantes

Al comparar entre sí los distintos tratamientos coadyuvantes administrados, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA de medias repetidas). Los grupos que, en función del test de contrastes contribuyeron a estas diferencias fueron el grupo 4 y 8. Los mejores resultados se obtuvieron en el grupo 4, que presentó las menores cifras de PIO en los días 1, 5, 7, 14 y 28, siendo superado únicamente por el grupo 2 en el día 21 y por el grupo 5 en el postoperatorio inmediato. Al comparar entre sí los grupos con implante cargado con MMC (grupos 4, 5 y 7), a pesar de los mejores resultados obtenidos por el grupo 4, sólo se detectaron diferencias a favor de éste último en el día 14 ($P = 0,038$ frente al grupo 5 y $0,049$ frente al grupo 7).

Las mayores cifras de supervivencia de la ampolla se alcanzaron con el grupo 4, seguido por el grupo 2. Los grupo 6 y 8, en cambio, evidenciaron los peores datos de supervivencia de la ampolla. Llama la atención la irregularidad de las cifras de PIO del grupo 6, el cual, a pesar de diferir significativamente del grupo control en tres momentos del postoperatorio, dio lugar a una supervivencia quirúrgica similar a la de este grupo (11,3 y 11,9 días respectivamente). A pesar de los resultados descritos, no se detectaron diferencias estadísticas entre los grupos de estudio al comparar las curvas de supervivencia ($P = 0,17$) (figura 22, tabla 10).

4.2. Características de la ampolla filtrante

De acuerdo con la clasificación del Moorfields adaptada al conejo, se evaluaron cuatro características: área y altura de la ampolla y vascularización de ampolla y conjuntiva sana. Además, en los grupos con implante (grupos 3, 4, 5 y 7), se valoró su presencia o ausencia. En el análisis estadístico se emplearon pruebas no paramétricas, al tratarse de variables ordinales.

4.2.1. Evaluación del modelo experimental

A fin de evaluar la utilidad del modelo experimental en términos de formación de ampolla filtrante, estudiamos las características de ésta en el grupo control. En la mayoría de los animales se evidenció la formación precoz de una

ampolla filtrante en el área de la trabeculectomía. Dicha ampolla destacó más por su extensión que por su altura (97,5% de los controles tenían una ampolla grado 3-5 de extensión, frente al 2,5% que tenían una ampolla grado 3-4 de altura, al cabo de 1 día). A partir de este momento, la ampolla se redujo de forma progresiva. Así, al cabo de 28 días de la intervención, había desaparecido en todos los ojos control (100% de las ampollas con grado 1 de extensión y altura). En términos estadísticos, la ampolla se hizo patente en cuanto a su extensión en los días 1, 5, 7 (P < 0,001, todos ellos) y 9 (P = 0,002), no existiendo diferencias significativas a partir de dicho momento (figura 30, tabla 25). En lo que respecta a la altura, únicamente hubo diferencias con la situación basal en los días 1 (P < 0,001) y 5 (P = 0,005) (figura 31, tabla 26).

El análisis de supervivencia de la cirugía en relación a la persistencia de la ampolla filtrante, se realizó únicamente atendiendo a la extensión de la ampolla. Se logró una supervivencia media de la ampolla de 12,9 días en el grupo control, teniendo como criterio de fracaso el aplanamiento de la misma (grado 1 de extensión de ampolla) (figura 34, tabla 29).

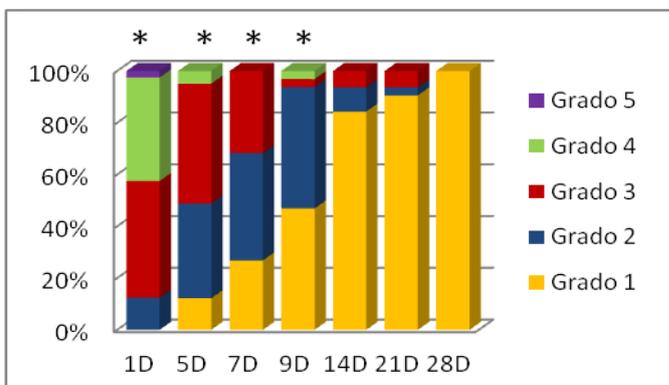


Tabla 25. Área de ampolla (grupo control; grados 1-5).

Día	G1	G2	G3	G4	G5
1		12,5	45	40	2,5
5	12,2	36,6	46,3	4,9	
7	26,8	41,5	31,7		
9	46,9	46,9	3,1	3,1	
14	84,4	9,4	6,3		
21	90,6	3,1	6,3		
28	100				

Figura 30. Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo control. * Diferencias significativas respecto al basal.

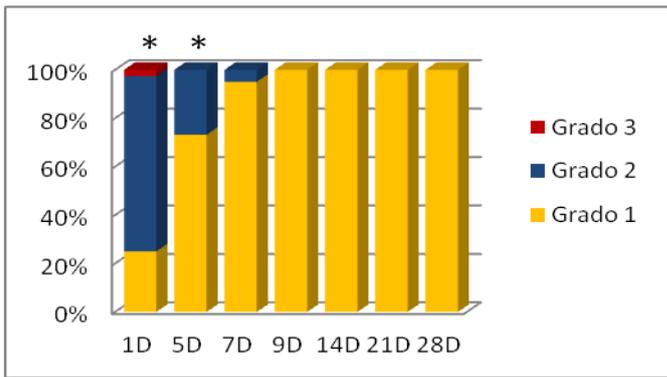


Tabla 26. Altura de ampolla (grupo control; grados 1-3).

Día	G1	G2	G3
1	25	72,5	2,5
5	73,2	26,8	
7	95,1	4,9	
9	100		
14	100		
21	100		
28	100		

Figura 31. Evolución de la altura de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo control. * Diferencias significativas respecto al basal.

La vascularización de la ampolla, se redujo de forma progresiva a lo largo del seguimiento, existiendo diferencias en relación al preoperatorio al cabo de 1, 5, 7, 9, 14 ($P < 0,001$ en todos ellos) y 21 días ($P = 0,02$) (figura 32, tabla 27). Al cabo de un mes, se normalizó esta variable, no existiendo diferencias con la situación basal. La conjuntiva sana presentó igualmente un patrón decreciente en el grado de hiperemia. Se detectaron diferencias estadísticas con respecto a la conjuntiva sana basal en los días 1 ($P < 0,001$), 5 ($P = 0,003$), 7 ($P = 0,004$), 9 ($P = 0,025$) y 14 ($P = 0,0025$), normalizándose la vascularización a partir de dicho momento (figura 33, tabla 28).

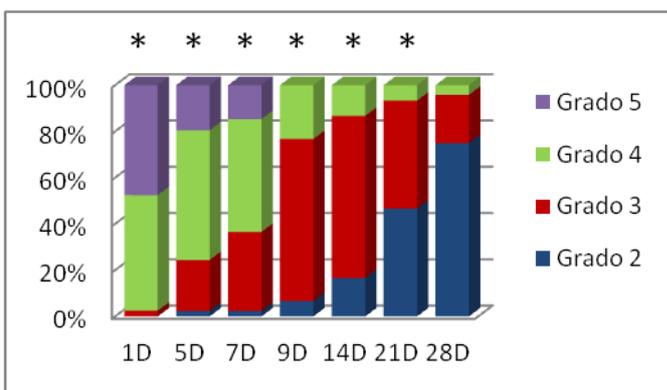


Tabla 27. Vascularización de ampolla (grupo control; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1		2,5	50	47,5
5	2,4	22	56,1	19,5
7	2,4	34,1	48,8	14,6
9	6,7	70	23,3	
14	16,7	70	13,3	
21	46,7	46,7	6,7	
28	75	20,8	4,2	

Figura 32: Evolución de la vascularización de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo control. * Diferencias significativas respecto al basal

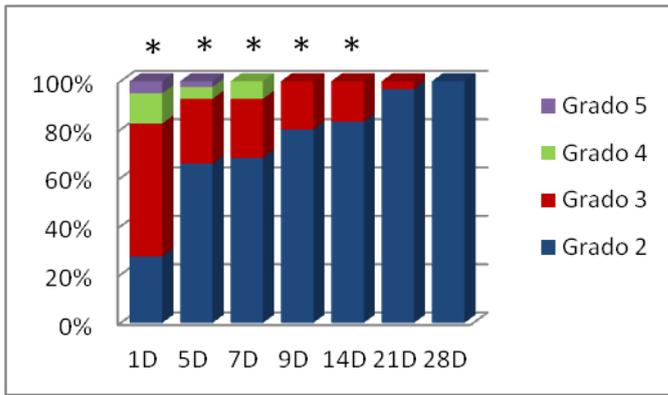


Tabla 28. Vascularización de conjuntiva sana (grupo control; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1	27,5	55	12,5	5
5	65,9	26,8	4,9	2,4
7	68,3	24,4	7,3	
9	80	20		
14	83,3	16,7		
21	96,7	3,3		
28	100			

Figura 33. Evolución de la vascularización de la conjuntiva sana a lo largo del tiempo (días) en el grupo control. * Diferencias significativas respecto al basal.

4.2.2. Evaluación de los tratamientos coadyuvantes

La influencia de cada tratamiento coadyuvante en las características de la ampolla filtrante se estudió en cada momento del estudio de forma comparativa con el grupo control (apartado 4.2.1), empleando el test U de Mann-Whitney, al tratarse de una variable ordinal.

En la elaboración de las curvas de supervivencia de la ampolla se suprimieron los grupos de conejos que llevaban implante (tabla 29). Esto se debe a que el implante, por el efecto espaciador, simula la aparición de una ampolla, en la cual es imposible discernir qué parte corresponde a la ampolla real o al implante. De igual forma, las comparaciones estadísticas en cuanto a área y altura de ampolla podrían estar sesgadas en los conejos con implante.

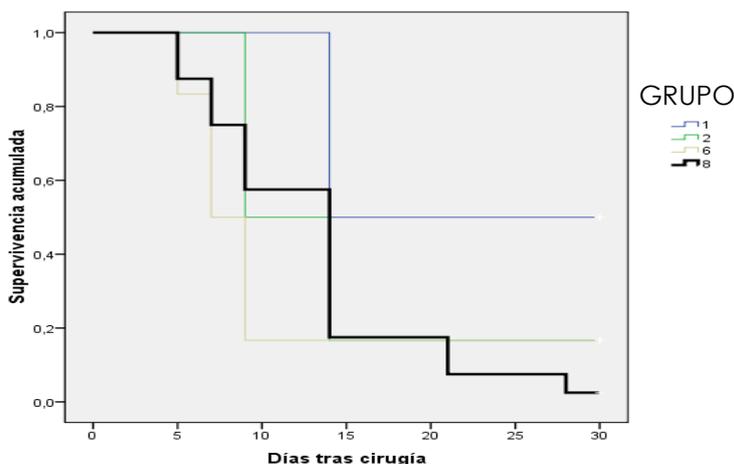


Tabla 29. Supervivencia quirúrgica por grupos.

Grupo	Superv. media
1	22
2	14,1
6	11,1
8	12,9

Figura 34. Supervivencia quirúrgica en función de la ampolla, mediante el método de Kaplan-Meier.

- **Grupo 1: MMC tópica**

La ampolla se redujo progresivamente en superficie y altura con el transcurso del seguimiento. Al comparar con los controles, no se evidenciaron diferencias estadísticas en ninguna de las variables estudiadas (días 1, 5 y 7 y 28) (figura 35-38, tablas 30-33). De los grupos sin implante, éste es el que presentó una mayor supervivencia de la ampolla (22 días) (tabla 28). Esta cifra difiere del grupo control (12,9 días) sobre todo por efecto del área de ampolla del día 28. En este momento, a pesar de la ausencia de diferencias entre ambos grupos, se observó una P próxima al nivel de significación estadística ($P = 0,07$).

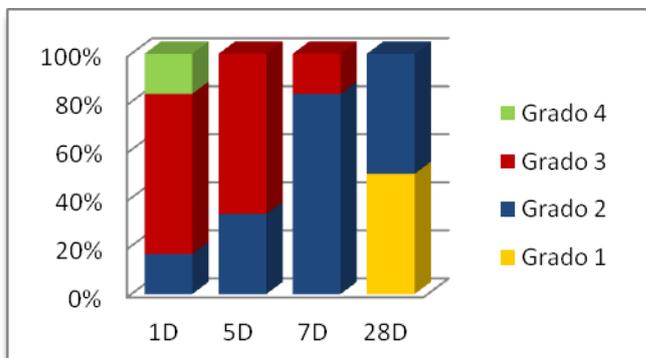


Figura 35. Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 1. No diferencias respecto al control.

Tabla 30. Área de ampolla (grupo 1; grados 1-4).

Día	G1	G2	G3	G4
1		16,7	66,6	16,7
5		33,3	66,7	
7		83,3	16,7	
28	50	50		

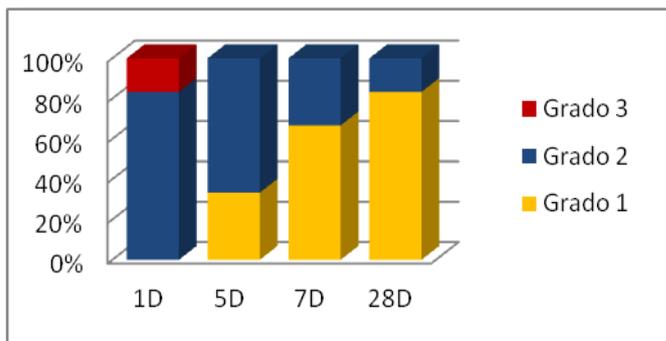


Figura 36. Evolución de la altura de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 1. No diferencias respecto al control.

Tabla 31. Altura de ampolla (grupo 1; grados 1-3).

Día	G1	G2	G3
1		83,3	16,7
5	33,3	66,7	
7	66,7	33,3	
28	83,3	16,7	

La vascularización de la ampolla y conjuntiva sana presentaron un patrón decreciente similar a la que se observó en los ojos control (figuras 37 y 38; tablas 32 y 33).

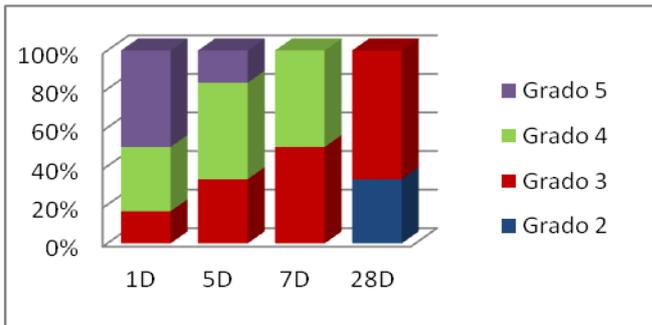


Tabla 32. Vascularización de ampolla (grupo 1; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1		16,7	33,3	50
5		33,3	50	16,7
7		50	50	
28	33,3	66,7		

Figura 37. Evolución de la vascularización de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 1. No diferencias respecto al control.

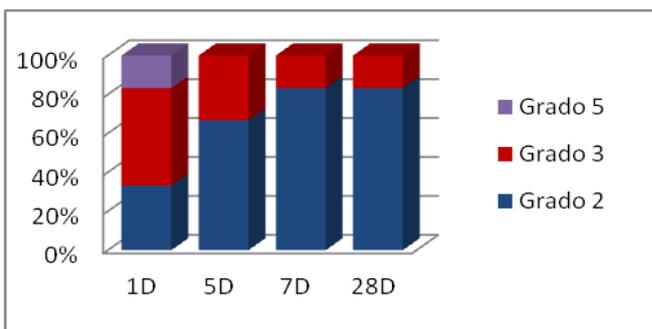


Tabla 33. Vascularización de conjuntiva sana (grupo 1; grados 2-5).

Día	G2	G3	G5
1	33,3	50	16,7
5	66,7	33,3	
7	83,3	16,7	
28	83,3	16,7	

Figura 38. Evolución de la vascularización de conjuntiva sana a lo largo del tiempo (días) en el grupo 1. No diferencias respecto al control.

• **Grupo 2: 5-FU tópico**

En los momentos estudiados (días 1, 5, 7 y 28), no existieron diferencias en las variables de la ampolla con respecto a los ojos control, a excepción del área de ampolla a los 5 días, que fue superior en los ojos tratados con 5-FU ($P=0,037$) (figuras 39-42, tablas 34-37). La supervivencia media de la ampolla en este grupo fue de 14,1 días (tabla 29).

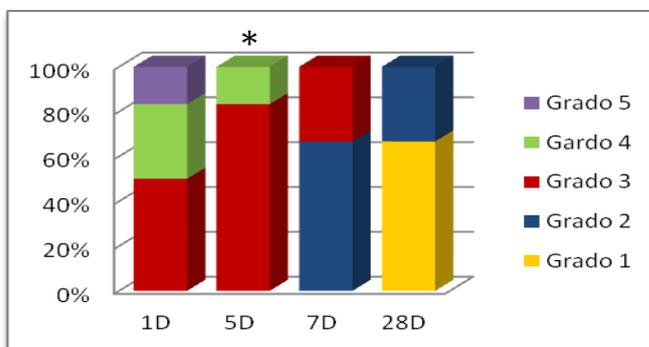


Tabla 34. Área de ampolla (grupo 2; grados 1-5).

Día	G1	G2	G3	G4	G5
1			50	33,3	16,7
5			83,3	16,7	
7		66,7	33,3		
28	66,7	33,3			

Figura 39. Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 2. * Diferencias significativas respecto al control

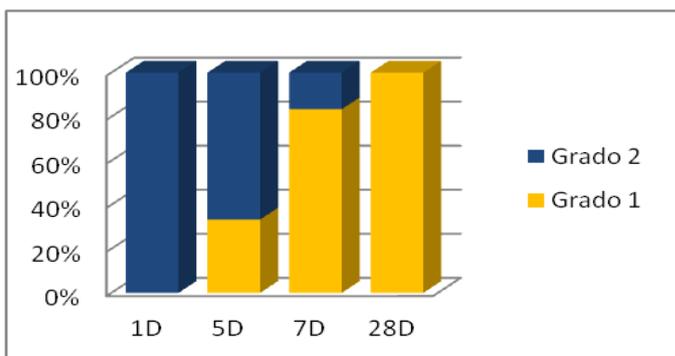


Tabla 35. Altura de ampolla (grupo 2; grados 1-2).

Día	G1	G2
1		100
5	33,3	66,7
7	83,3	16,6
28	100	

Figura 40. Evolución de la altura de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 2. No diferencias respecto al control.

La vascularización de la ampolla y conjuntiva sana experimentaron un descenso paulatino, que no difirió estadísticamente de la que presentaban los ojos control.

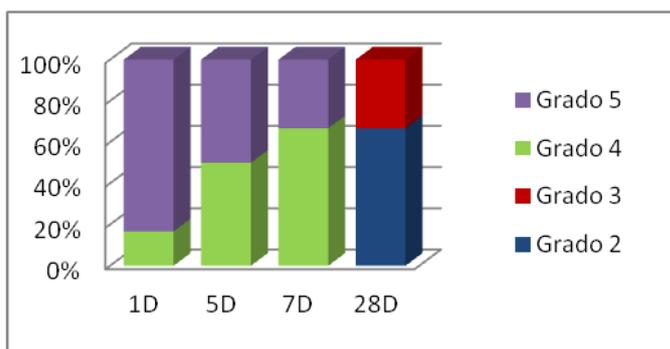


Tabla 36. Vascularización de ampolla (grupo 2; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1			16,7	83,3
5			50	50
7			66,7	33,3
28	66,7	33,3		

Figura 41. Evolución de la vascularización de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 2. No diferencias respecto al control.

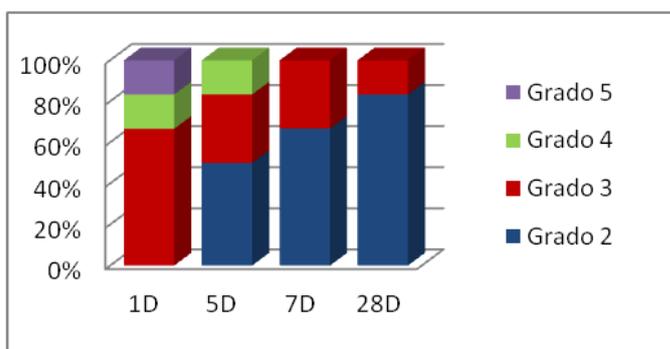


Tabla 37. Vascularización de conjuntiva sana (grupo 2; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1		66,6	16,7	16,7
5	50	33,3	16,7	
7	66,7	33		
28	83,3	16,7		

Figura 42. Evolución de la vascularización de conjuntiva sana a lo largo del tiempo (días) en el grupo 2. No diferencias respecto al control.

• Grupo 3: Implante

Los ojos con implante presentaron ampollas más extensas que los controles al cabo de 1 día ($P = 0,03$), 5 días ($P = 0,004$), 7 días ($P = 0,002$), 9 días ($P < 0,001$) y 14 días ($P < 0,001$) (figura 43, tabla 38). En cambio, no existieron diferencias entre ambos grupos al cabo de 21 días. En cuanto a la altura, los ojos con implante evidenciaron ampollas más elevadas en todos los momentos del estudio ($P < 0,001$ en todos los casos) (figura 44, tabla 39).

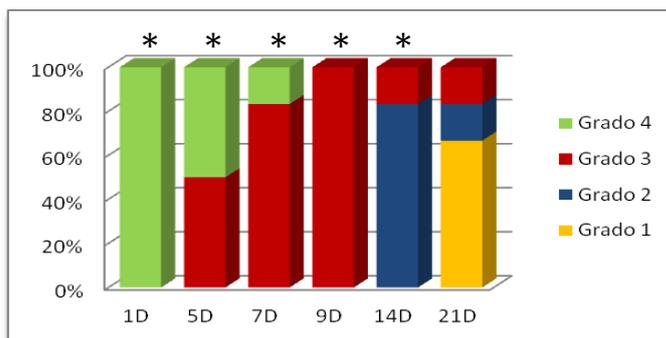


Figura 43. Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 3. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 38. Área de ampolla (grupo 3; grados 1-4).

Día	G1	G2	G3	G4
1				100
5			50	50
7			83,3	16,7
9			100	
14		83,3	16,7	
21	66,7	16,7	16,7	

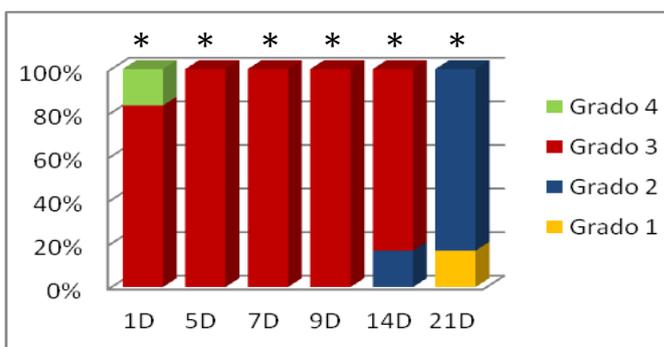


Figura 44. Evolución de la altura de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 3. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 39. Altura de ampolla (grupo 3; grados 1-4).

Día	G1	G2	G3	G4
1			83,3	16,7
5			100	
7			100	
9			100	
14		16,7	83,3	
21	16,7	83,3		

La hiperemia conjuntival en la ampolla fue más severa en los ojos con implante que en los controles en todos los momentos y, de forma estadísticamente significativa al cabo de 5 días ($P = 0,029$), 7 días ($P = 0,034$), 9 días ($P < 0,001$), 14 días ($P = 0,001$) y 21 días ($P = 0,026$) (figura 45, tabla 40). La vascularización de la conjuntiva sana fue mayor en los ojos con implante, principalmente al cabo de 1 día ($P = 0,002$), 5 días ($P = 0,002$), 7 días ($P = 0,009$) y 9 días ($P = 0,003$)

(figura 46, tabla 41). El implante se hizo patente en todos los conejos en las dos primeras semanas tras la intervención y sólo en uno de ellos al cabo de 21 días.

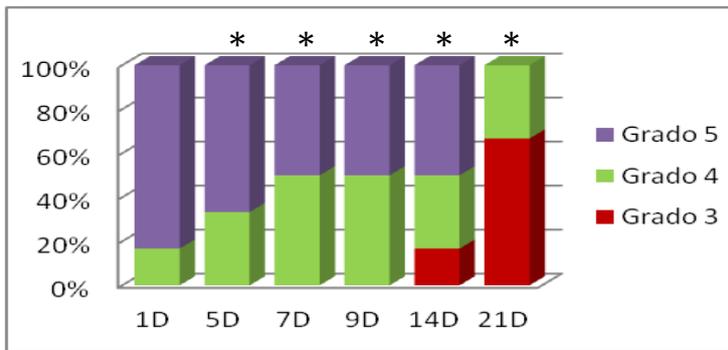


Figura 45. Evolución de la vascularización de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 3. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 40. Vascularización de ampolla (grupo 3; grados 3-5).

Día	G3	G4	G5
1		16,7	83,3
5		33,3	66,7
7		50	50
9		50	50
14	16,7	33,3	50
21	66,7	33,3	

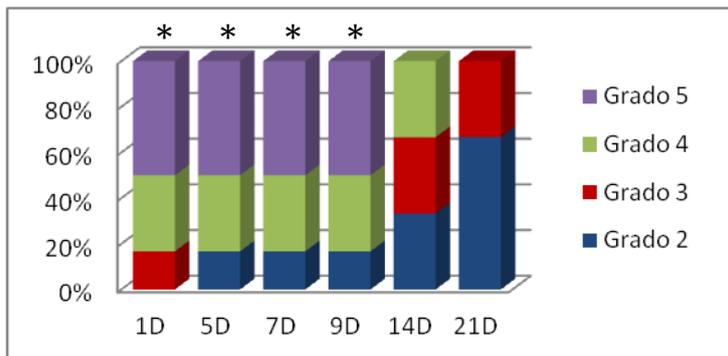


Figura 46: Evolución de la vascularización de conjuntiva sana a lo largo del tiempo (días) en el grupo 3. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 41. Vascularización de conjuntiva sana (grupo 3; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1		16,7	33,3	50
5	16,7		33,3	50
7	16,7		33,3	50
9	16,7		33,3	50
14	33,3	33,3	33,3	
21	66,7	33,3		

• Grupo 4: Implante con microesferas de MMC recubierto con MMC

El empleo de implantes cargados con MMC dio lugar a la formación de ampollas más extensas que en los controles a lo largo de todo el seguimiento y, de forma significativa, en el transcurso de 5 días ($P = 0,015$), 7 días ($P = 0,001$), 9 días ($P < 0,001$), 14 días ($< 0,001$), 21 días ($P < 0,001$) y 28 días de la trabeculectomía ($P = 0,001$) (figura 47, tabla 42). De igual forma, la altura de la ampolla fue superior en los ojos con implante en todos los momentos ($P < 0,001$ en todos los casos) (figura 48, tabla 43).

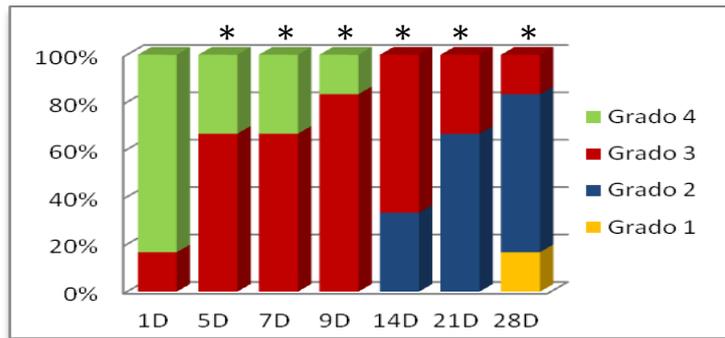


Figura 47. Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 4. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 42. Área de ampolla (grupo 4; grados 1-4).

Día	G1	G2	G3	G4
1			16,7	83,3
5			66,7	33,3
7			66,7	33,3
9			83,3	16,7
14		33,3	66,7	
21		66,7	33,3	
28	16,7	66,6	16,7	

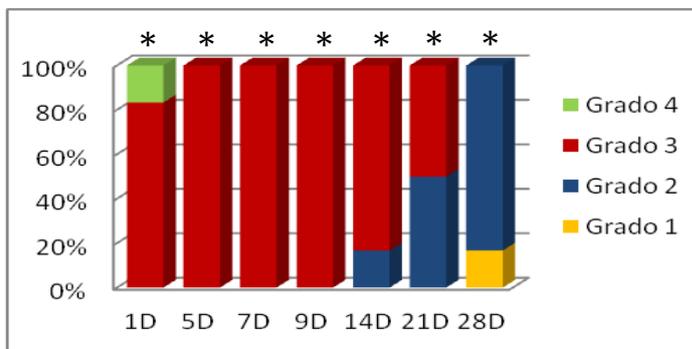


Figura 48. Evolución de la altura de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 4. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 43. Altura de ampolla (grupo 4; grados 1-4).

Día	G1	G2	G3	G4
1			83,3	16,7
5			100	
7			100	
9			100	
14		16,7	83,3	
21		50	50	
28	16,7	83,3		

La hiperemia conjuntival de la ampolla fue más marcada en los ojos con implante que en los controles al cabo de 1 día ($P = 0,039$), 5 días ($P = 0,005$), 7 días ($P = 0,002$), 9 días ($P < 0,001$), 14 días ($P < 0,001$), 21 días ($P = 0,002$) y 28 días ($P = 0,015$) (figura 49, tabla 44). Sin embargo, la vascularización de la conjuntiva sana fue similar entre ambos grupos, no existiendo diferencias estadísticas en ninguno de los momentos (figura 50, tabla 45). El implante era patente en todos los ojos durante las dos primeras semanas tras la cirugía y, en la mitad de los casos en el día 21. Un mes tras la cirugía, el implante era indetectable en todos los ojos.

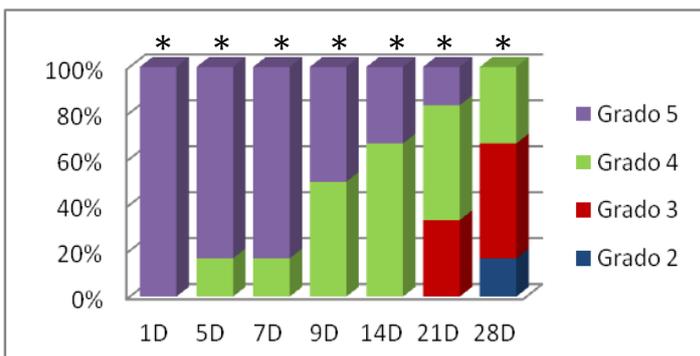


Figura 49. Evolución de la vascularización de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 4. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 44. Vascularización de ampolla (grupo 4; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1				100
5			16,7	83,3
7			16,7	83,3
9			50	50
14			66,7	33,3
21		33,3	50	16,7
28	16,7	50	33,3	

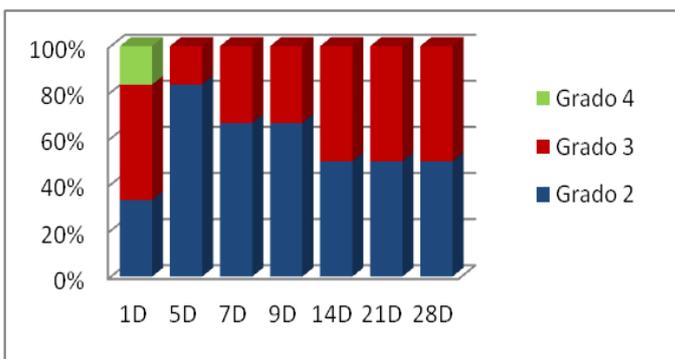


Figura 50. Evolución de la vascularización de conjuntiva sana a lo largo del tiempo (días) en el grupo 4. Ausencia de diferencias respecto al control.

Tabla 45. Vascularización de conjuntiva sana (grupo 4; grados 2-4).

	G2	G3	G4
1	33,3	50	16,7
5	83,3	16,7	
7	66,7	33,3	
9	66,7	33,3	
14	50	50	
21	50	50	
28	50	50	

• **Grupo 5: Implante con microesferas de MMC recubierto con 5-FU**

Los ojos intervenidos mediante trabeculectomía con implante cargado con MMC y recubierto con 5-FU, presentaron ampollas más extensas y elevadas que los controles en todos los momentos. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los puntos ($P < 0,001$) a excepción del día 28 (figuras 51 y 52, tablas 46 y 47).

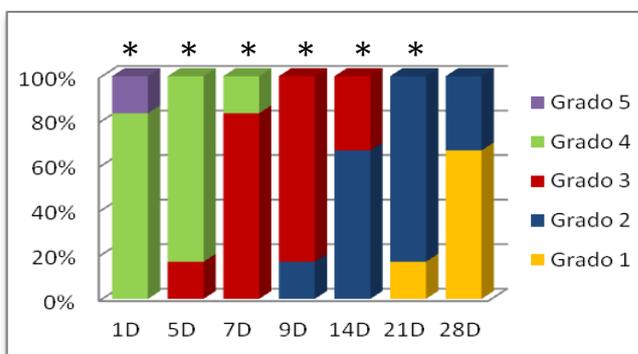


Figura 51. Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 5. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 46. Área de ampolla (grupo 5; grados 1-5).

Día	G1	G2	G3	G4	G5
1				83,3	16,7
5			16,7	83,3	
7			83,3	16,7	
9		16,7	83,3		
14		66,7	33,3		
21	16,7	83,3			
28	66,7	33,3			

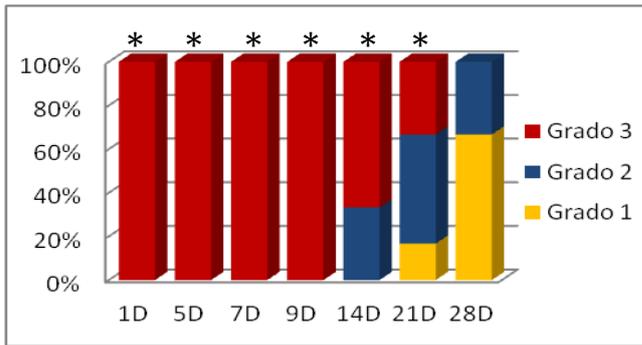


Figura 52: Evolución de la altura de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 5. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 47. Altura de ampolla (grupo 5; grados 1-3).

Día	G1	G2	G3
1			100
5			100
7			100
9			100
14		33,3	66,7
21	16,7	50	33,3
28	66,7	33,3	

La vascularización de la ampolla fue más intensa en los ojos con implante que en los controles al cabo de 1 día ($P = 0,039$), 5 días ($P = 0,005$), 7 días ($P = 0,002$), 9 días ($P < 0,001$), 14 días ($P < 0,001$), 21 días ($P = 0,023$) y 28 días ($P = 0,031$) (figura 53, tabla 48). La conjuntiva sana presentó una hiperemia más marcada en los ojos con implantes en todos los momentos del estudio. Sin embargo, estas diferencias fueron significativas únicamente al cabo de 9 ($P = 0,001$) y 14 días ($P = 0,009$) (figura 54, tabla 49). Se evidenció la presencia de implante en todos los ojos durante los primeros 21 días tras la cirugía y en el 66,7% de los casos al cabo de un mes.

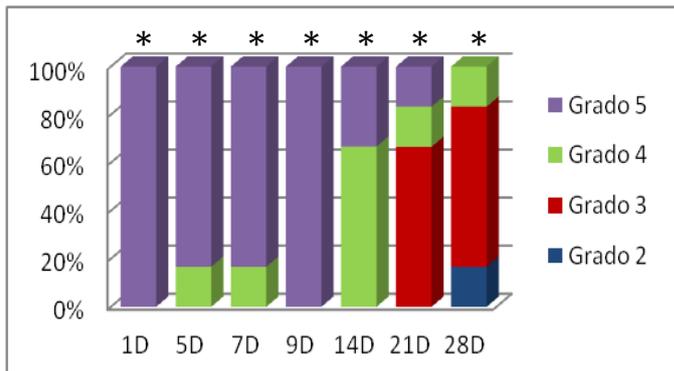


Figura 53. Evolución de la vascularización de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 5. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 48. Vascularización de ampolla (grupo 5; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1				100
5			16,7	83,3
7			16,7	83,3
9				100
14			66,7	33,3
21		66,7	16,7	16,7
28	16,7	66,6	16,7	

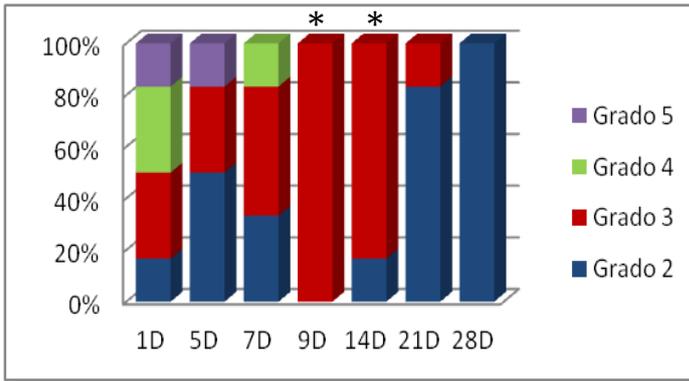


Tabla 49. Vascularización de conjuntiva sana (grupo 5; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1	16,7	33,3	33,3	16,7
5	50	33,3		16,7
7	33,3	50	16,7	
9		100		
14	16,7	83,3		
21	83,3	16,7		
28	100			

Figura 54. Evolución de la vascularización de conjuntiva sana a lo largo del tiempo (días) en el grupo 5. * Diferencias significativas respecto al control.

• **Grupo 6: Bevacizumab subconjuntival**

La administración de bevacizumab subconjuntival no permitió originar ampollas más extensas o elevadas que en los controles, no existiendo diferencias estadísticas a lo largo del postoperatorio (figuras 55 y 56, tablas 50 y 51). La supervivencia media de la ampolla en este grupo fue de 11,1 días, inferior a la del grupo control (tabla 29).

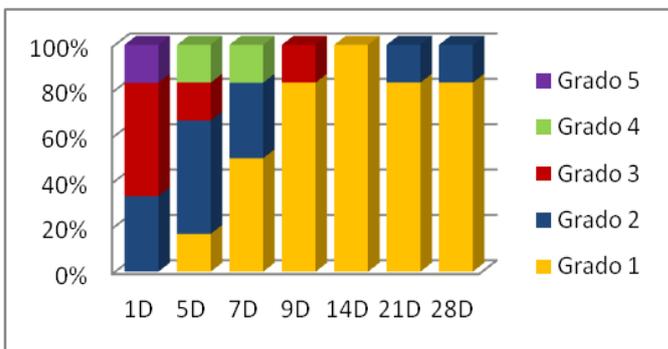


Tabla 50. Área de ampolla (grupo 6; grados 1-5).

Día	G1	G2	G3	G4	G5
1		33,3	50		16,7
5	16,7	49,9	16,7	16,7	
7	50	33,3		16,7	
9	83,3		16,7		
14	100				
21	83,3	16,7			
28	83,3	16,7			

Figura 55: Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 6. No diferencias respecto al control.

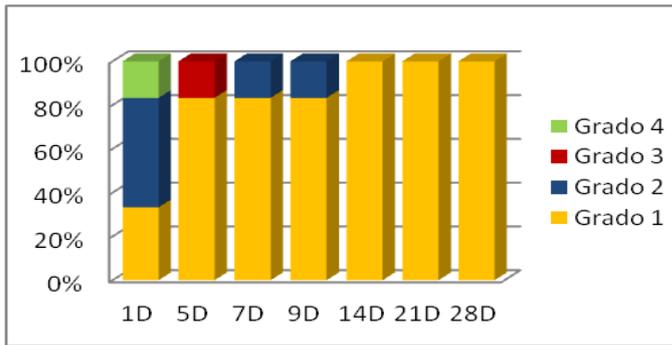


Figura 56. Evolución de la altura de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 6. No diferencias respecto al control.

Tabla 51. Altura de ampolla

Día	G1	G2	G3	G4
1	33,3	50		16,7
5	83,3		16,7	
7	83,3	16,7		
9	83,3	16,7		
14	100			
21	100			
28	100			

La vascularización conjuntival en la ampolla y conjuntiva sana fue similar en los ojos tratados con bevacizumab y los controles en todos los momentos, a excepción del postoperatorio precoz. En esta fase, la vascularización de la ampolla y de la conjuntiva sana, fueron superiores en el grupo control (P = 0,003 y DNS respectivamente, día 1) (figuras 57 y 58, tablas 52 y 53).

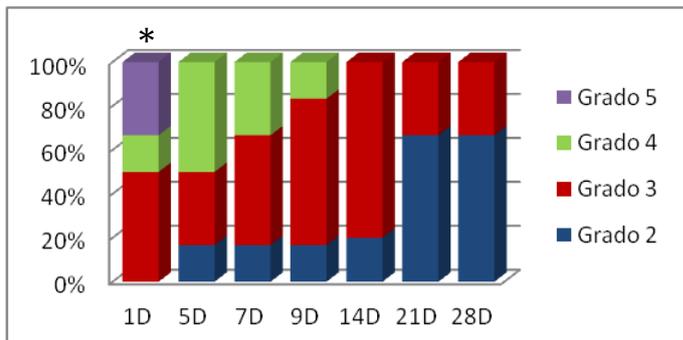


Figura 57. Evolución de la vascularización de la ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 6. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 52. Vascularización de ampolla (grupo 6; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1		50	16,7	33,3
5	16,7	33,3	50	
7	16,7	50	33,3	
9	16,7	66,6	16,7	
14	20	80		
21	66,7	33,3		
28	66,7	33,3		

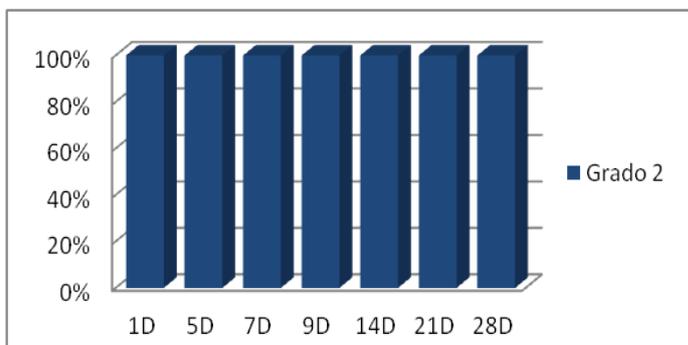


Figura 58. Evolución de la vascularización de la conjuntiva sana a lo largo del tiempo (días) en el grupo 6. No diferencias respecto al control.

Tabla 53. Vascularización de conjuntiva sana (grupo 6; grado 2).

Día	G2
1	100
5	100
7	100
9	100
14	100
21	100
28	100

• Grupo 7: Implantes con MMC y bevacizumab subconjuntival

Los ojos que recibieron implante presentaron ampollas filtrantes significativamente más extensas y elevadas que los controles en todo el postoperatorio ($P < 0,001$ en todos los casos) (figuras 59 y 60, tablas 54 y 55).

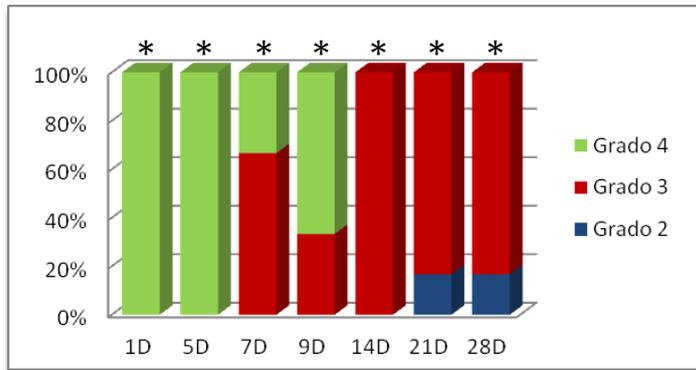


Figura 59. Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 7. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 54. Área de ampolla (grupo 7; grados 2-4).

Día	G2	G3	G4
1			100
5			100
7		66,7	33,3
9		33,3	66,7
14		100	
21	16,7	83,3	
28	16,7	83,3	

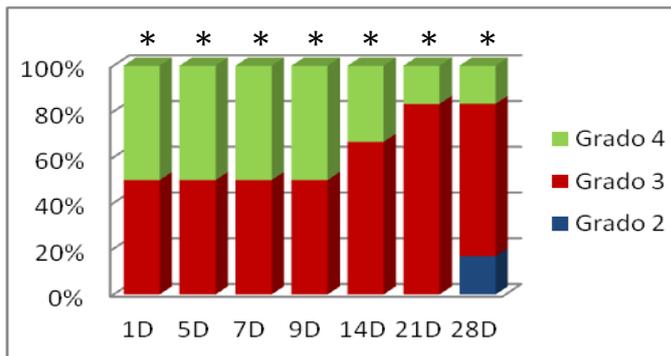


Figura 60. Evolución de la altura de ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 7. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 55. Altura de ampolla (grupo 7; grados 2-4).

Día	G2	G3	G4
1		50	50
5		50	50
7		50	50
9		50	50
14		66,7	33,3
21		83,3	16,7
28	16,7	66,6	16,7

La hiperemia conjuntival de la ampolla filtrante fue superior en el grupo del implante al cabo de 1 día (DNS), 5 días ($P = 0,001$), 7 días ($P < 0,001$), 9 días ($P < 0,001$), 14 días ($P < 0,001$), 21 días ($P < 0,001$) y 28 días ($P < 0,001$) (figura 61, tabla 56). La vascularización de la conjuntiva sana fue, igualmente, más marcada en los ojos que recibieron implante que en los controles. Las diferencias fueron significativas en todos los casos ($P < 0,001$) excepto al cabo de un día de la cirugía (figura 62, tabla 57). La permanencia del implante se objetivó en todos los ojos al cabo de 21 días de la cirugía, y en la mitad de ellos al cabo de un mes.

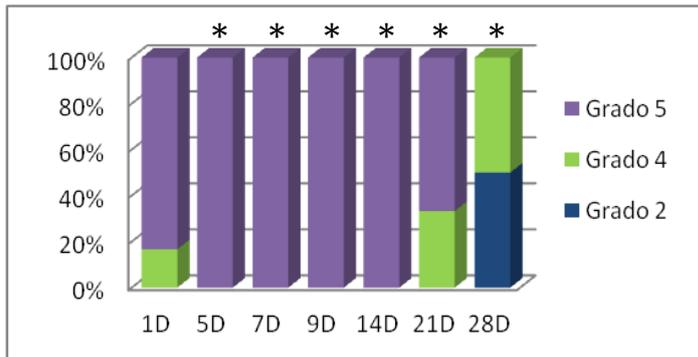


Figura 61. Evolución de la vascularización de la ampolla a lo largo del tiempo (días) en el grupo 7. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 56. Vascularización de ampolla (grupo 7; grados 2-5).

Día	G2	G4	G5
1		16,7	83,3
5			100
7			100
9			100
14			100
21		33,3	66,7
28	50	50	

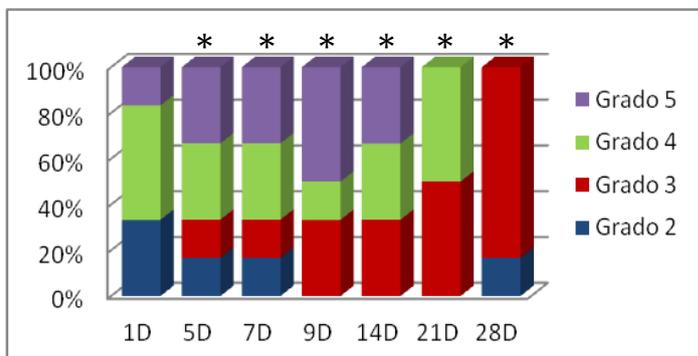


Figura 62. Evolución de la vascularización de la conjuntiva sana a lo largo del tiempo (días) en el grupo 7. * Diferencias significativas respecto al control.

Tabla 57. Vascularización de conjuntiva sana (grupo 7; grados 2-5).

Día	G2	G3	G4	G5
1	33,3		50	16,7
5	16,7	16,7	33,3	33,3
7	16,7	16,7	33,3	33,3
9		33,3	16,7	50
14		33,3	33,3	33,3
21		50	50	
28	16,7	83,3		

4.2.3. Comparación entre tratamientos coadyuvantes

La comparación entre grupos en relación a las variables de la ampolla evidenció diferencias estadísticas: área y altura de ampolla ($P < 0,001$ en todos los casos salvo área en el día 1), vascularización de ampolla ($P < 0,001$ en todos los casos salvo vascularización en el día 1: $P = 0,01$) vascularización de conjuntiva sana ($P < 0,001$ tras día 9, $P = 0,001$ en día 5, $P = 0,002$ en día 1).

- **Área de ampolla**

El área de ampolla filtrante se redujo paulatinamente en todos los grupos a lo largo del seguimiento. Los grupos con implante presentaron mayores grados de extensión. De ellos, el grupo 7 presentó una ampolla más prominente al final del experimento. Los grupos con ampolla menos extensa fueron los grupos 6 y 8 (bevacizumab y control) (figura 63).

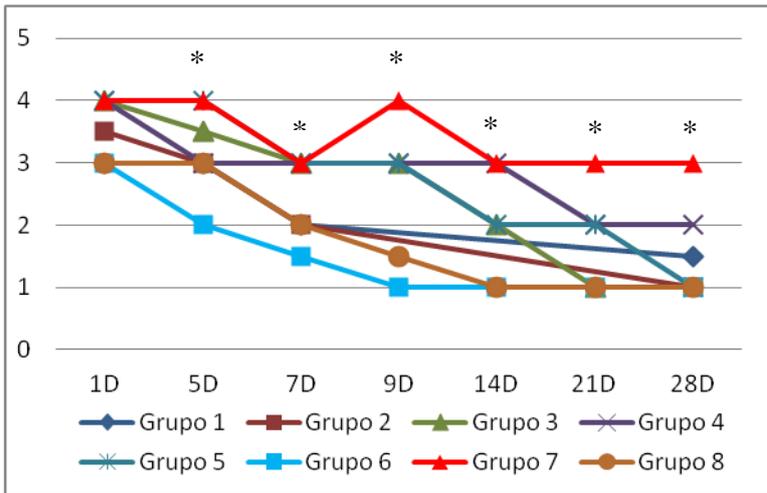


Figura 63. Evolución del área de ampolla a lo largo del tiempo (días) en cada grupo. Valores correspondientes a la mediana del grado de extensión de la ampolla.* Diferencias estadísticas entre grupos.

• **Altura de ampolla**

Evolucionó de forma paralela al área de la ampolla, si bien, en los animales sin implante era indetectable más allá del séptimo día. En los grupos con implante, quizás de forma artefactual, fue más prominente a lo largo de todo el estudio, especialmente en el grupo 7 (figura 64).

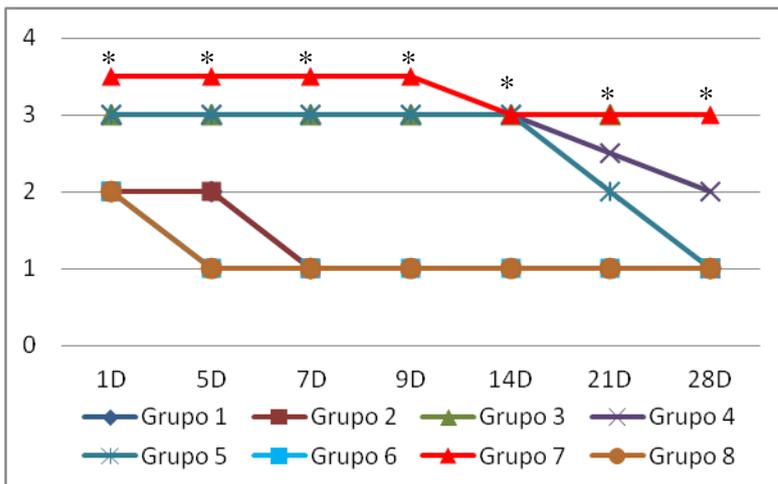


Figura 64. Evolución de la altura de la ampolla a lo largo del tiempo (días) en cada grupo. Valores correspondientes a la mediana del grado de altura de la ampolla.* Diferencias estadísticas entre grupos.

• Vascularización de la ampolla

A pesar de que la vascularización disminuyó a lo largo del seguimiento, fue más intensa en los conejos con implante. El grupo implante con MMC y bevacizumab presentó una ampolla más hiperémica que los restantes (figura 65).

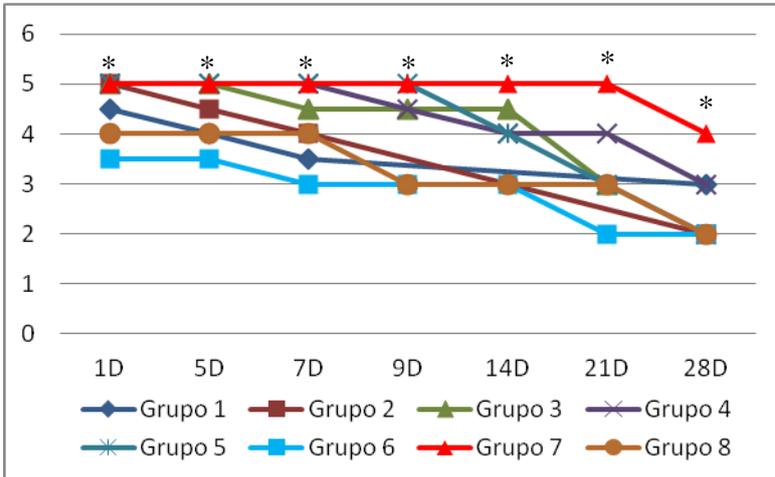


Figura 65. Evolución de la vascularización de la ampolla a lo largo del tiempo (días) en cada grupo. Valores correspondientes a la mediana del grado de vascularización. * Diferencias estadísticas entre grupos.

• Vascularización de la conjuntiva sana

La vascularización de la conjuntiva sana fue más marcada en los grupos con implante y, de forma más intensa, en el grupo 7. La conjuntiva sana se normalizó con la evolución del postoperatorio (figura 66).

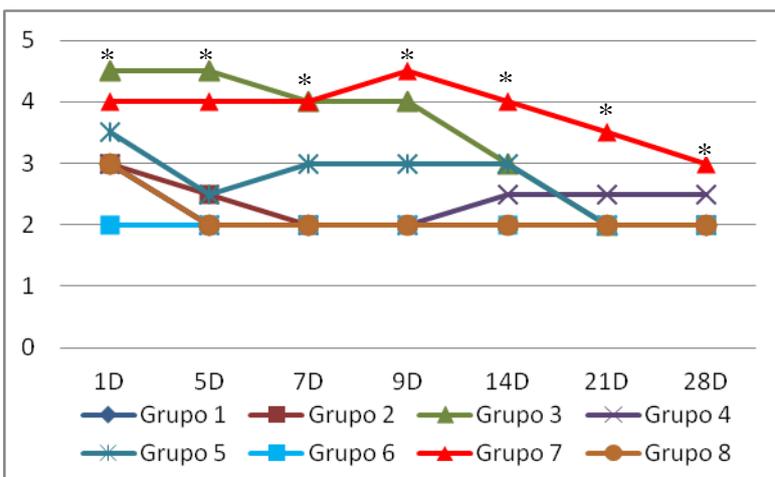


Figura 66. Evolución de la vascularización de la conjuntiva sana en cada grupo (días). Valores correspondientes a la mediana del grado de vascularización. * Diferencias estadísticas entre grupos.

La comparación entre las curvas de supervivencia de la ampolla, tras excluir los grupos con implante (grupos 3, 4, 5 y 7), mostró diferencias entre los grupos estudiados ($P = 0,04$). Estas diferencias se dieron por la mayor supervivencia de la ampolla en el grupo 1 (22 días) que en los grupos 2 (14,1 días), 6 (11,1 días) y 8 (12,95 días) (figura 34, tabla 29).

4.3. Estudio de correlación presión intraocular-ampolla filtrante

Con objeto de medir el grado de asociación entre el descenso de la PIO y las características morfológicas de la ampolla filtrante, empleamos el test de correlación no paramétrico de Spearman en cada momento de estudio. La elección de este test se debe al hecho de comparar una variable ordinal y una variable cuantitativa continua.

- Correlación PIO-área de ampolla

En todos los casos existió una correlación negativa entre ambas variables. Esta correlación fue significativa únicamente en el día 28 ($r_s = -0,259$; $P = 0,03$).

- Correlación PIO-altura de ampolla

Como era de esperar, se evidenció una correlación negativa entre ambas variables. Se observó una correlación estadísticamente significativa en el día 5 ($r_s = -0,262$; $P = 0,017$), día 14 ($r_s = -0,28$; $P = 0,032$) y día 28 ($r_s = -0,329$; $P = 0,005$).

- Correlación PIO- vascularización de la ampolla

A excepción del primer día del postoperatorio, se evidenció una correlación negativa débil entre ambas variables. Encontramos significación estadística al cabo de 5 días ($r_s = -0,262$; $P = 0,017$) y 7 días ($r_s = -0,274$; $P = 0,012$),

Podríamos concluir afirmando que cuanto mayor es el tamaño y vascularización de la ampolla, menor es la PIO y viceversa.

Por otro lado, se observa que, con independencia del criterio de fracaso quirúrgico empleado (PIO o ampolla), se evidenciaron periodos similares de supervivencia media de la cirugía. Así, tras la exclusión de los grupos con

implante comentada previamente, la supervivencia fue mayor en el grupo 1 (21,6 y 22 días según PIO y ampolla respectivamente), seguido por el grupo grupo 2 (16,6 y 14,1 días), 8 (11,9 y 12,9 días respectivamente) y grupo 6 (11,3 y 11,1 días respectivamente). Llama la atención que el grupo con peores resultados, independientemente del parámetro utilizado, fue el grupo bevacizumab subconjuntival, el cual, a pesar de presentar una reducción de la PIO a largo plazo, presentó unas cifras de supervivencia quirúrgica inferiores a las del grupo control.

4.4. Representación de los grupos de estudio

En este apartado se describen los animales más representativos de cada grupo de estudio.

4.4.1. Grupo control (grupo 8)

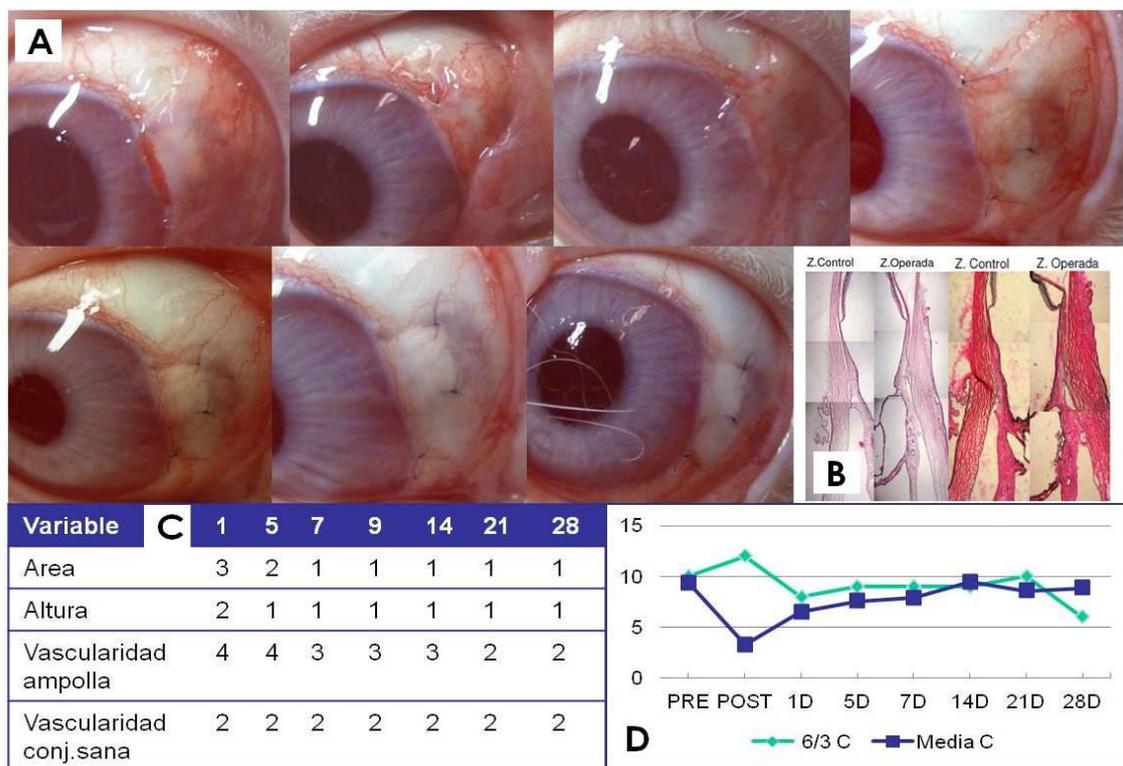


Figura 67. Evolución postoperatoria del grupo control. Fotografías de la ampolla filtrante (A). Análisis histológico (B). Variables de la ampolla filtrante (C). Valores de PIO (D).

4.4.2. Grupo MMC tópica (grupo 1)

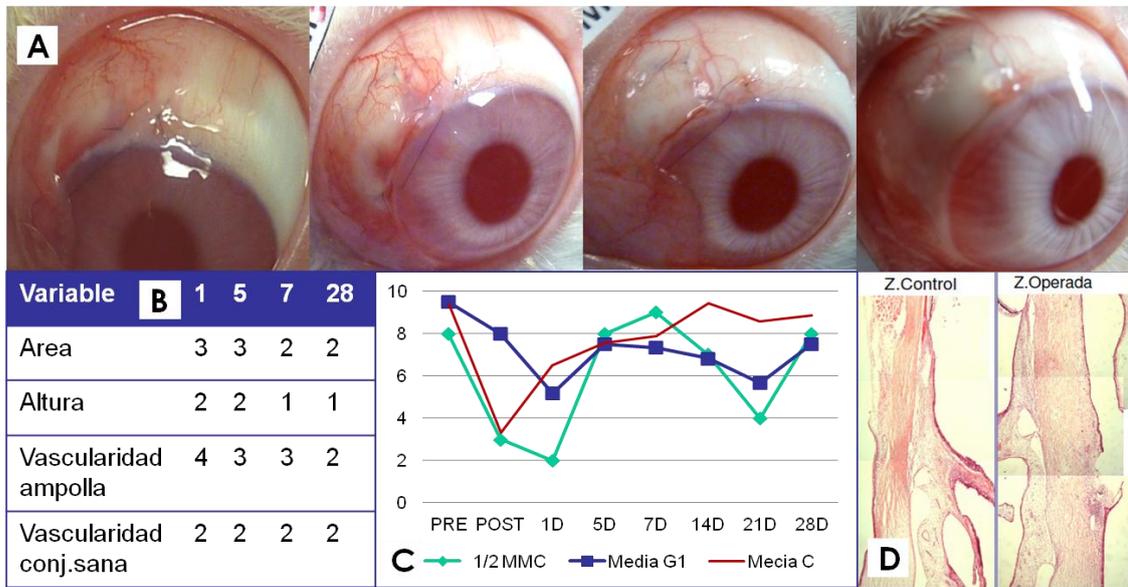


Figura 68. Evolución postoperatoria del grupo 1. Fotografías de la ampolla filtrante (A). Variables de la ampolla filtrante (B). Valores de PIO (C). Análisis histológico (D)

4.4.3. Grupo 5-FU tópico (grupo 2)

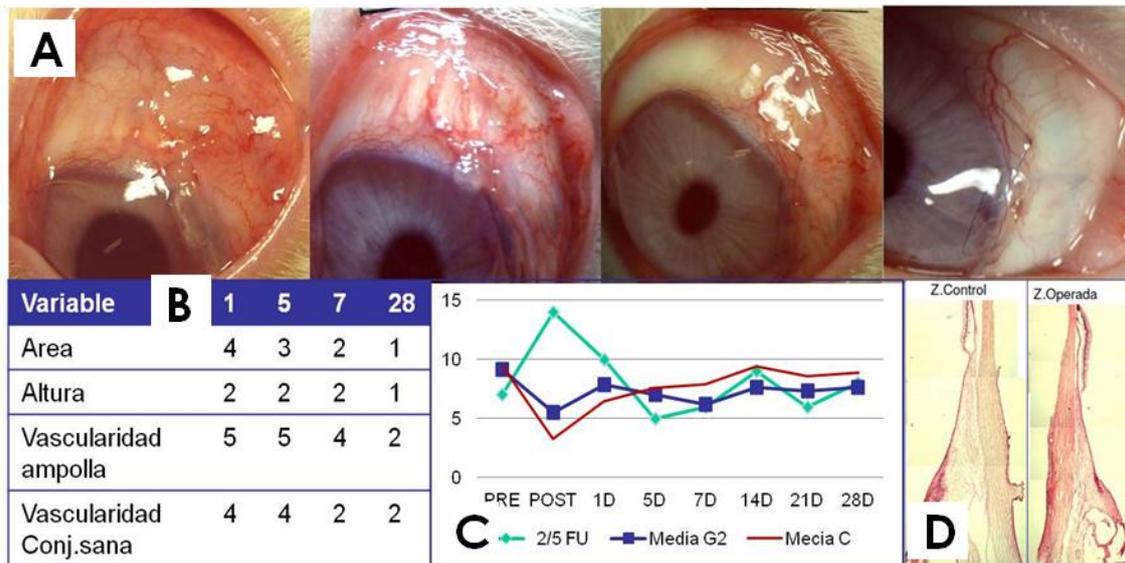


Figura 69. Evolución postoperatoria del grupo 2. Fotografías de la ampolla filtrante (A). Variables de la ampolla filtrante (B). Valores de PIO (C). Análisis histológico (D)

4.4.4. Grupo implante (grupo 3)

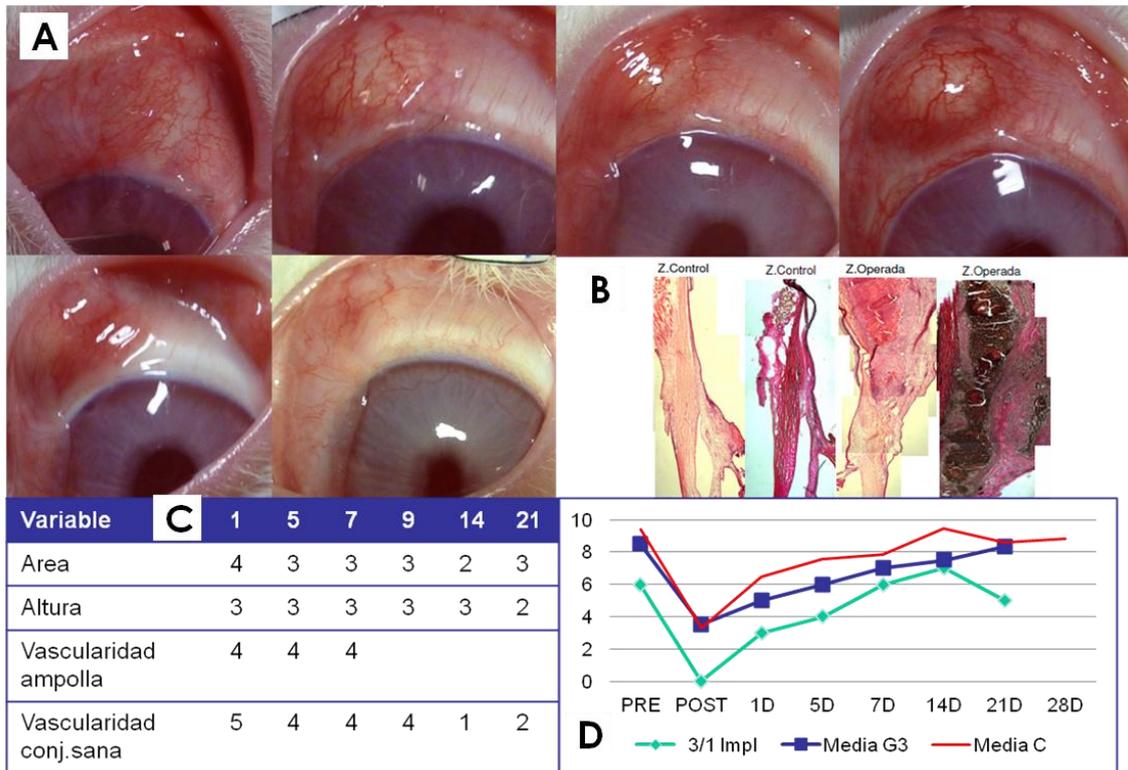


Figura 70. Evolución postoperatoria del grupo 3. Fotografías de la ampolla filtrante (A). Análisis histológico (B). Variables de la ampolla filtrante (C). Valores de PIO (D).

4.4.5. Grupo implante con MMC recubierto por MMC (grupo 4)

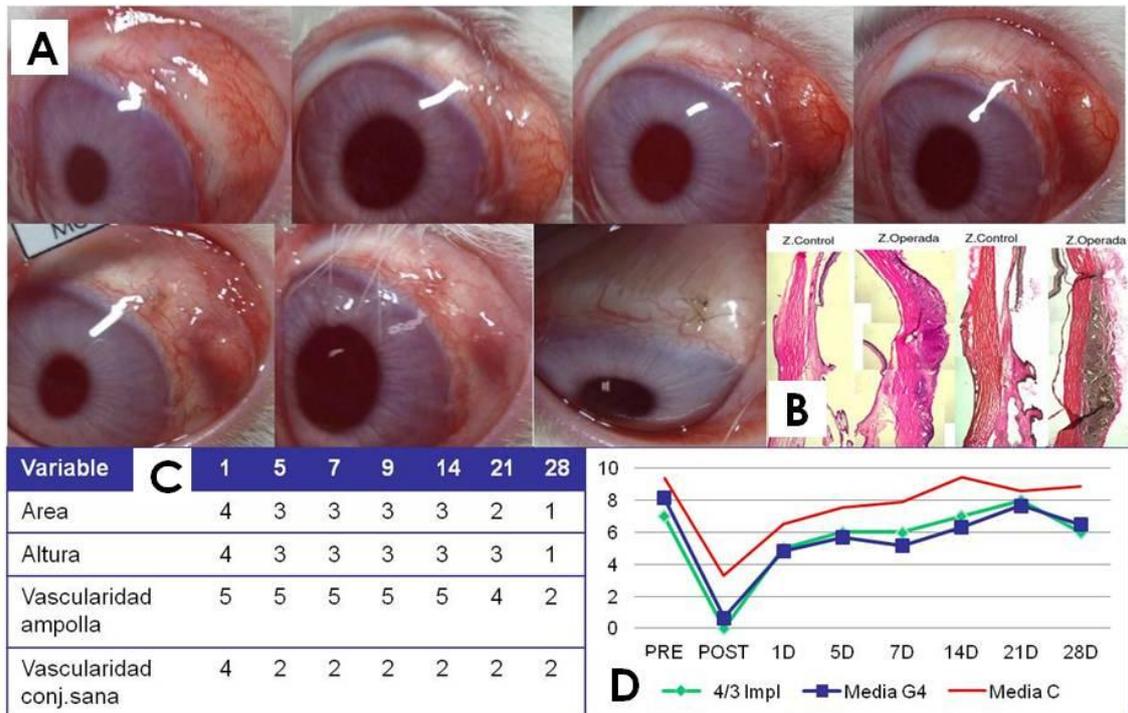


Figura 71. Evolución postoperatoria del grupo 4. Fotografías de la ampolla filtrante (A). Análisis histológico (B). Variables de la ampolla filtrante (C). Valores de PIO (D).

4.4.6. Grupo implante con MMC recubierto por 5-FU (grupo 5)

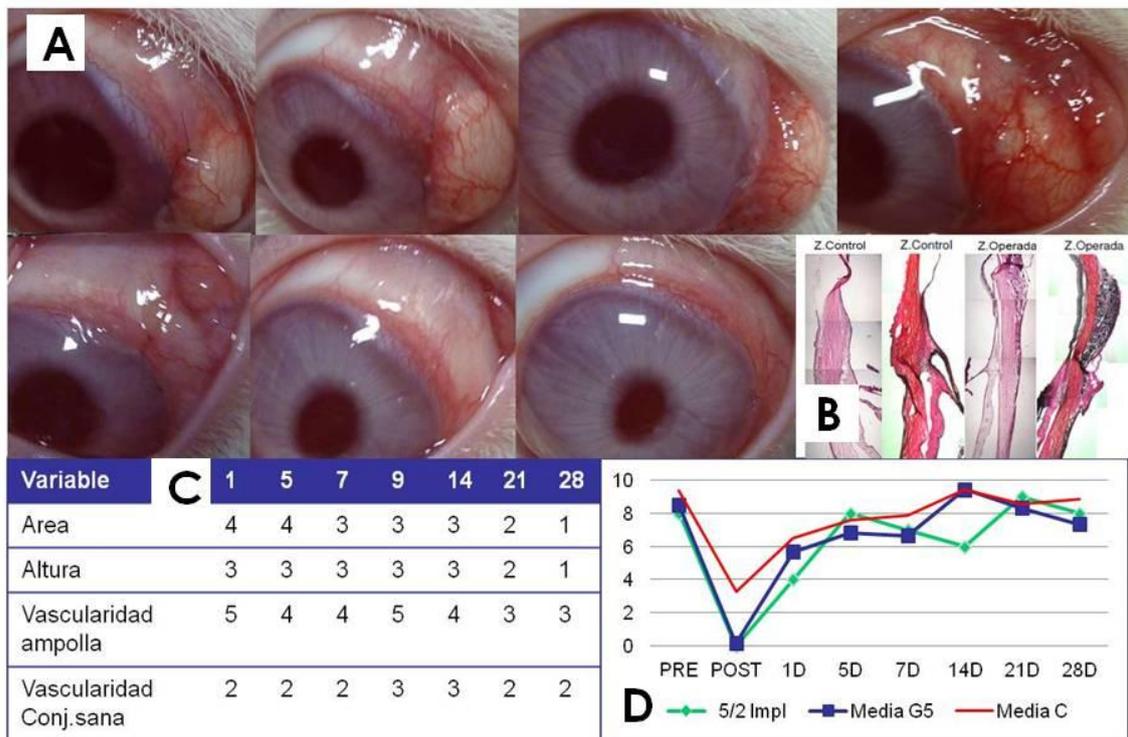


Figura 72. Evolución postoperatoria del grupo 5. Fotografías de la ampolla filtrante (A). Análisis histológico (B). Variables de la ampolla filtrante (C). Valores de PIO (D).

4.4.7. Grupo bevacizumab subconjuntival (grupo 6)

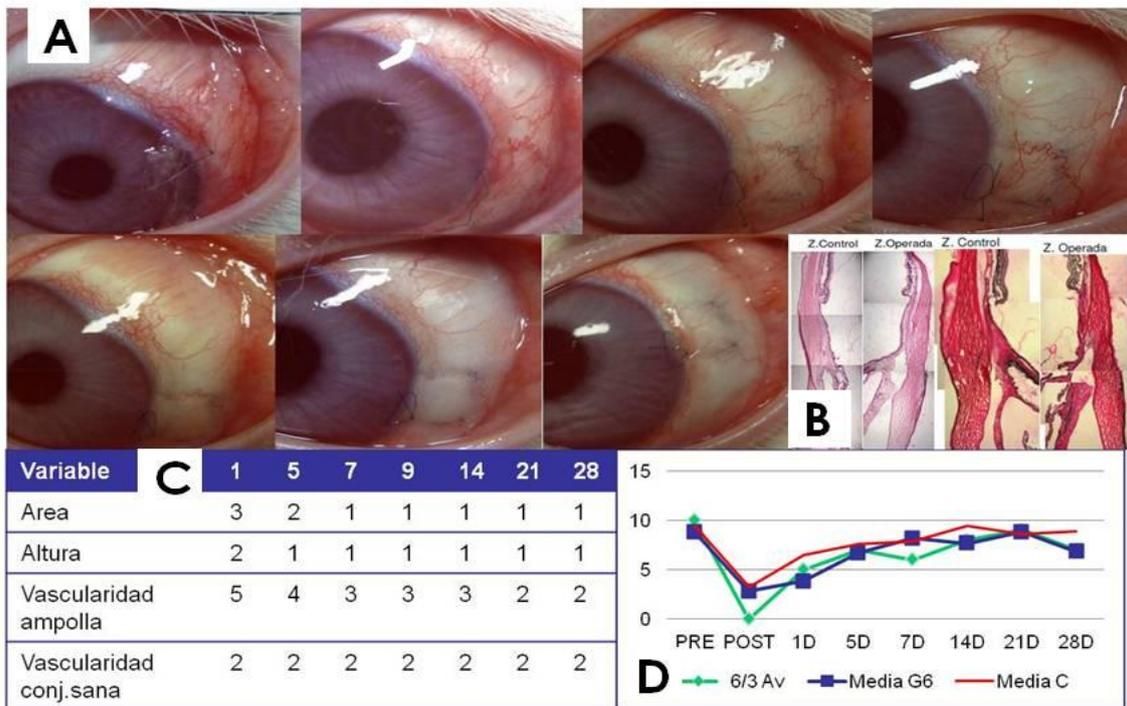


Figura 73. Evolución postoperatoria del grupo 6. Fotografías de la ampolla filtrante (A). Análisis histológico (B). Variables de la ampolla filtrante (C). Valores de PIO (D).

4.4.8. Grupo implante con MMC y bevacizumab subconjuntival (grupo 7)

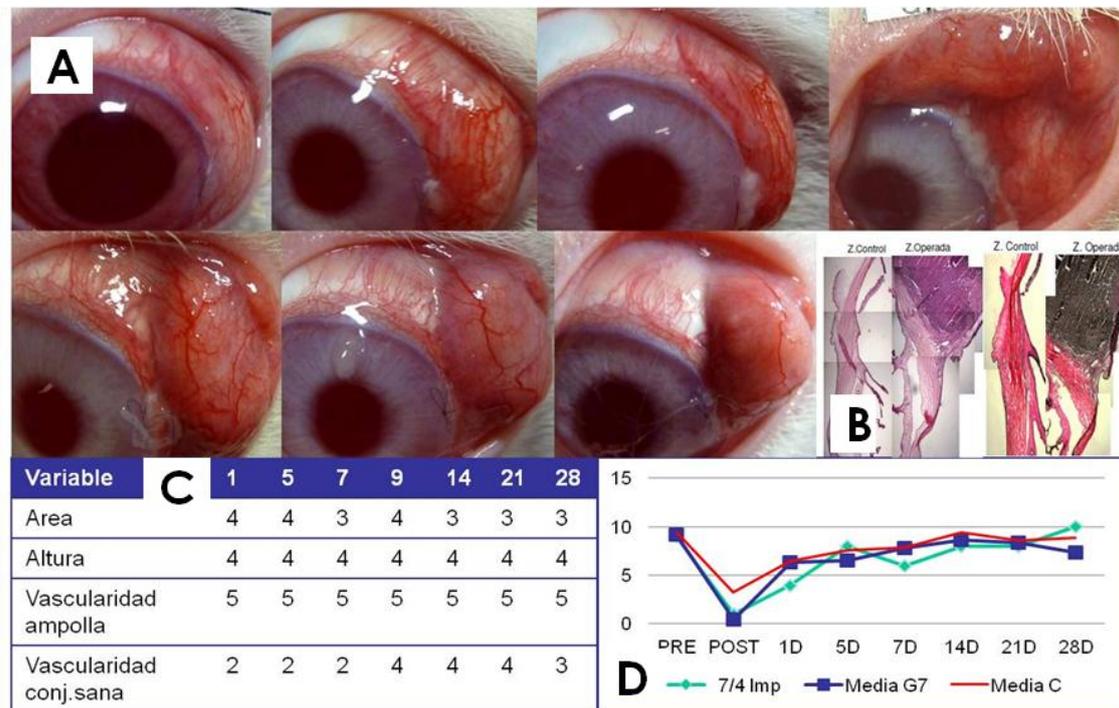


Figura 74. Evolución postoperatoria del grupo 7. Fotografías de la ampolla filtrante (A). Análisis histológico (B). Variables de la ampolla filtrante (C). Valores de PIO (D).

4.5. Complicaciones

4.5.1. Complicaciones intraoperatorias

En cinco de los animales se observaron sangrados intraoperatorios autolimitados en cámara anterior, que no implicaron un fracaso quirúrgico. Un ojo control presentó un sangrado masivo que dio lugar a una hipertensión postoperatoria mantenida, por lo que este ojo fue excluido del estudio (figura 75, B). En cinco casos se observó una posible vitreorragia al realizar la esclerotomía, la cual no implicó una hipertensión ocular postoperatoria en ninguno de los casos, como hubiera sido previsible. Por ello, pensamos que no se trató de una vitreorragia real, sino de un cambio en la viscosidad del humor acuoso inducida por la rotura de la barrera hematoacuosa, tal como se ha descrito previamente (Miller, et al., 1989).

4.5.2. Complicaciones postoperatorias

La evaluación fotográfica del segmento anterior durante el seguimiento pudo determinar las siguientes complicaciones: edema corneal (un conejo control),

ampolla avascular (un conejo del grupo 1), conjuntivitis (dos conejos pertenecientes a los grupos grupo 4 y 5), migración del implante (un conejo del grupo 5) (figura 75). Exceptuando la hemorragia, las restantes complicaciones cedieron espontáneamente a lo largo del seguimiento. En el caso de la hemorragia, se detectó una hipertensión severa y mantenida, por lo que dicho ojo fue excluido del estudio.

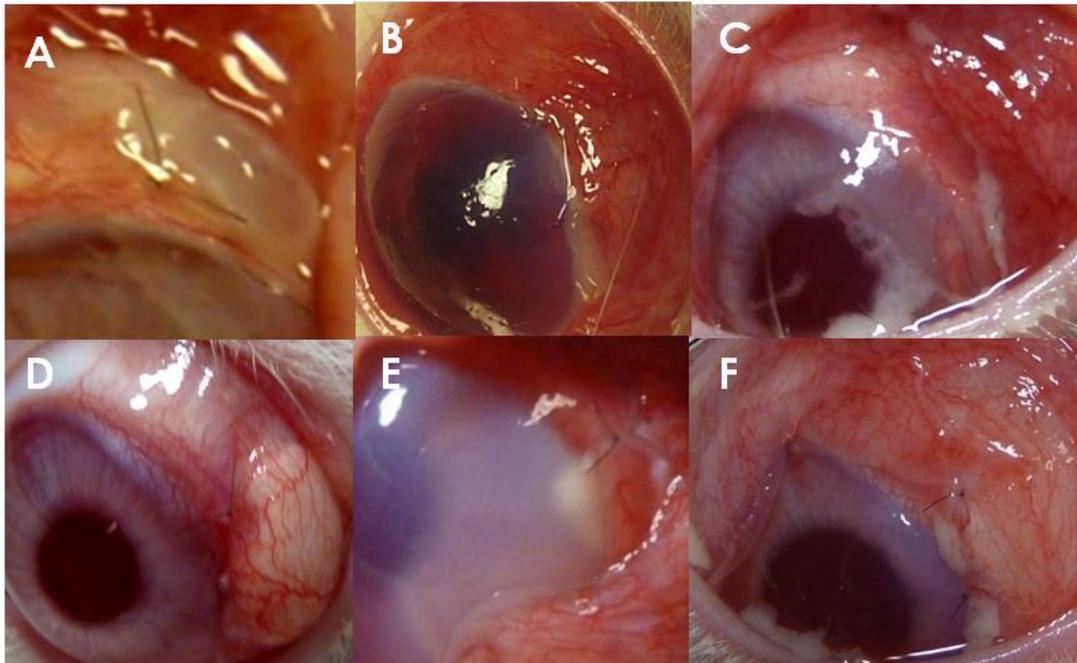


Figura 75. Complicaciones postoperatorias. Ampolla avascular (A). Hemorragia intraocular (B). Conjuntivitis (C, F). Migración del implante (D). Infiltrado y edema corneal (E).

5. EVALUACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

5.1. Análisis de la trabeculectomía

El análisis histológico de los globos oculares constató el cierre de la fístula quirúrgica en la gran mayoría de los casos. Sólo en dos de los conejos pudo constatar la persistencia de la esclerotomía al final del estudio (figura 76).

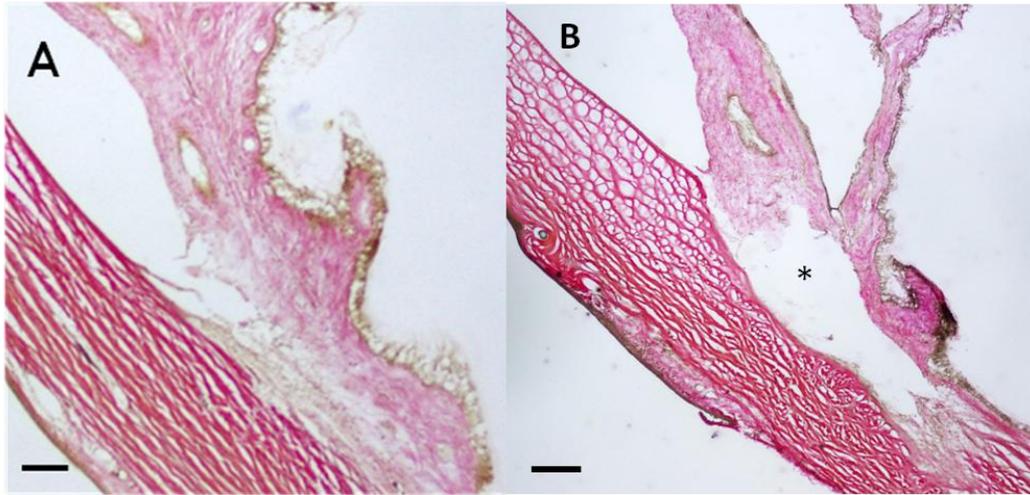


Figura 76. Región anatómica del ángulo iridocorneal en zona control (A) y zona intervenida (B). Se aprecia la persistencia de la esclerotomía (*). Tinción de Verhoeff. Barra = 100 μ m.

Al comparar la esclera de la zona operada con la de la zona control, se evidenció un aumento en la densidad del colágeno escleral en la zona intervenida (figura 77).

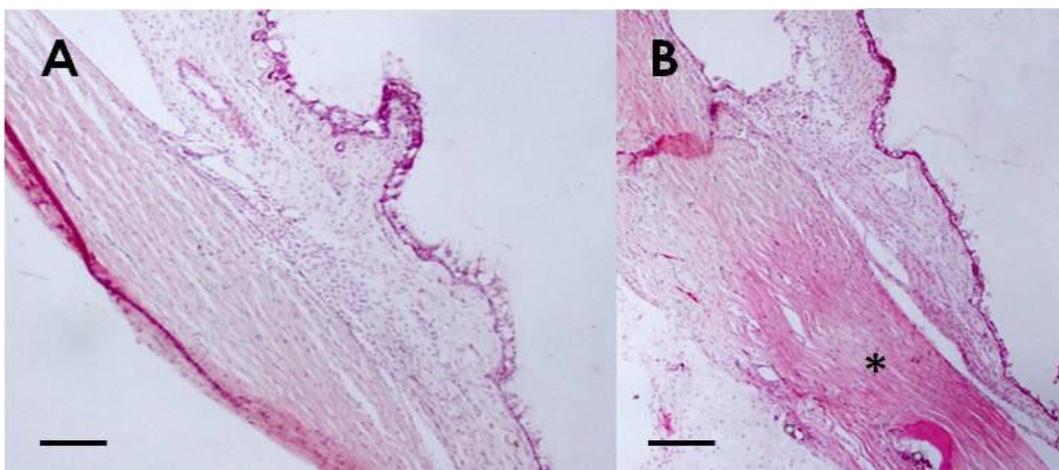


Figura 77. Región anatómica del ángulo iridocorneal en zona control (A) y zona intervenida (B). Se aprecia un aumento en la densidad escleral (*). Tinción de hematoxilina-eosina. Barra = 200 μ m.

El epitelio conjuntival bulbar normal es un epitelio estratificado formado por 3-5 capas celulares, con células caliciformes intercaladas. El estrato basal está formado por células cilíndricas, a diferencia de los estratos superficiales. En los ojos intervenidos de trabeculectomía (grupo control), se conservó la arquitectura celular, evidenciándose una disminución de la población de células caliciformes (figura 78). En los grupos tratados con MMC y 5-FU tópicos (grupos 1 y 2), se apreció un adelgazamiento epitelial, una alteración en la disposición de los estratos celulares y una infiltración subepitelial, principalmente linfoplasmocitaria. El grupo con implante vacío (grupo 3), compartió la infiltración inflamatoria con los grupos anteriores, sin embargo preservó las características anatómicas del epitelio normal, aunque con cierto descenso en la población celular de células caliciformes. Los animales con implantes cargados con antimetabólicos (grupos 4, 5 y 7), mostraron unas características similares a las de los grupos 1 y 2, con una mayor infiltración inflamatoria subepitelial. Llama la atención que el grupo 7 presentó un epitelio con alteraciones en la disposición celular, pero sin el adelgazamiento característico de los grupos 4 y 5. Por último, los animales con bevacizumab subconjuntival (grupo 6) mostraron importantes alteraciones epiteliales, infiltración y fibrosis estromal (figura 79).

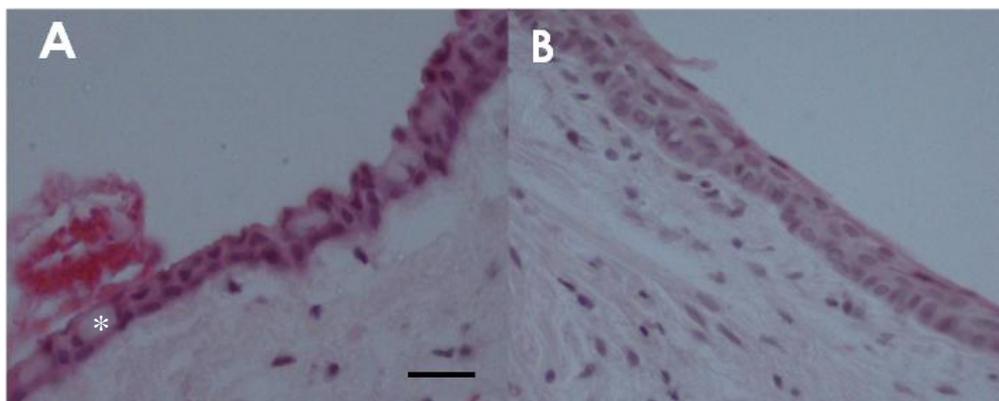


Figura 78: Detalle del epitelio conjuntival. Epitelio conjuntival normal, con presencia de células caliciformes (*) (A). Epitelio conjuntival de la ampolla, con disposición celular normal, pero sin células caliciformes (B). Tinción de hematoxilina-eosina. Barra = 50 μ m.

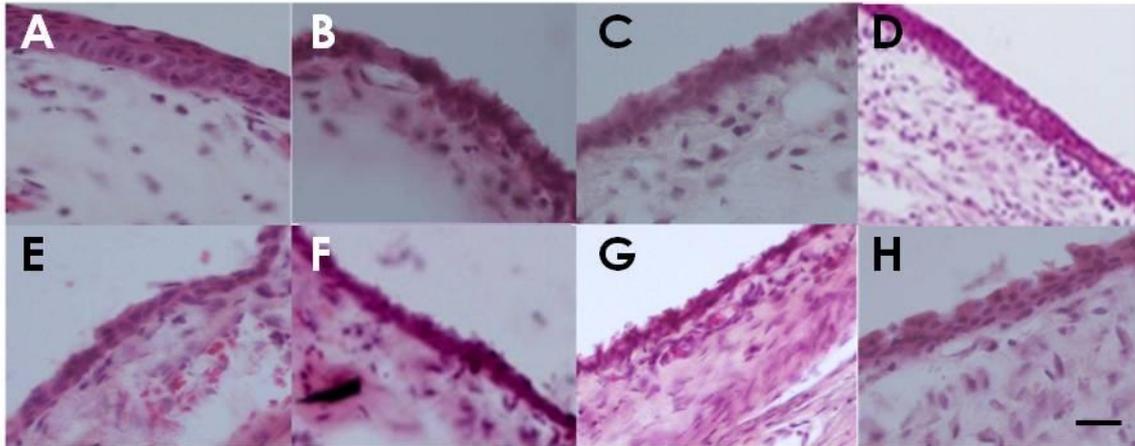


Figura 79: Detalle del epitelio conjuntival de la ampolla. Epitelio del grupo control (A). Epitelio adelgazado en los grupos 1 y 2 (B y C). Epitelio de espesor normal en el grupo 3 (D). Epitelio adelgazado y con infiltración subyacente en los grupos 4, 5 (E, F). Epitelio no adelgazado con infiltración en el grupo 7 (H). Epitelio adelgazado, con infiltración y fibrosis subepitelial en el grupo 6 (G). Tinción de hematoxilina-eosina. Barra = 50 μ m.

5.2. Características de la ampolla filtrante

En la mayor parte de los animales se constató la ausencia de ampolla filtrante en el momento de la realización de la necropsia (74% de los conejos tratados no presentaban ampolla), (figuras 80 y 81). De los conejos con implante, únicamente en cuatro (16,6%), se pudo verificar su presencia (tabla 58). En estos casos hubo una correlación negativa no significativa entre la PIO y presencia de ampolla ($r_s = -0,21$; $P = 0,38$).

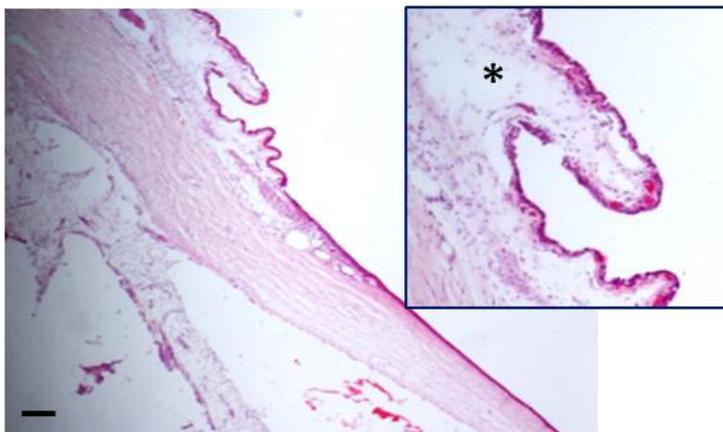


Figura 80: Aspecto de la ampolla filtrante. Se aprecia un estroma conjuntival laxo (*). Detalle de la ampolla. Tinción de hematoxilina-eosina. Barra = 200 μ m

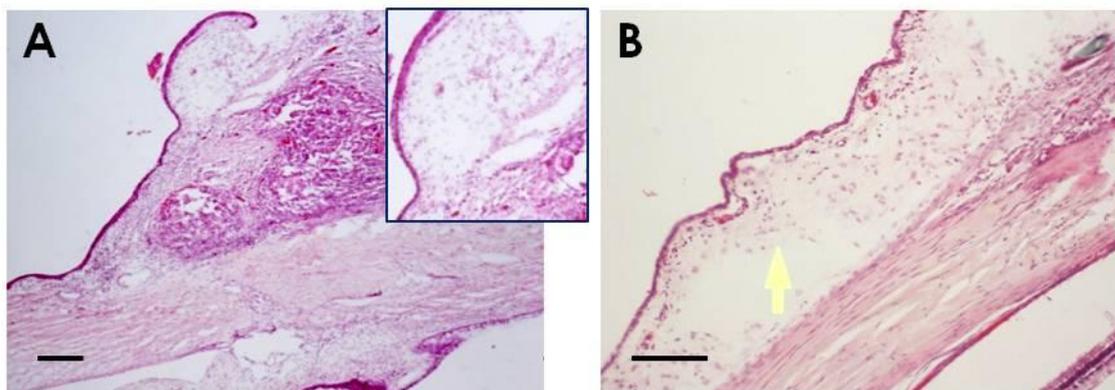


Figura 81: Ampolla filtrante. Laxitud estromal conjuntival en animal con implante de PLGA **(A)** y sin implante **(B. flecha)**. Tinción de hematoxilina-eosina. Barra = 200 μ m

5.3. Características del implante

5.3.1. Infiltrado celular

La infiltración celular se pudo constatar en todos los casos en los que permaneció el implante a lo largo del estudio. En el infiltrado se observaron principalmente células linfoplasmocitarias y ocasionalmente macrófagos, polimorfonucleares y células gigantes multinucleadas (Figura 82).

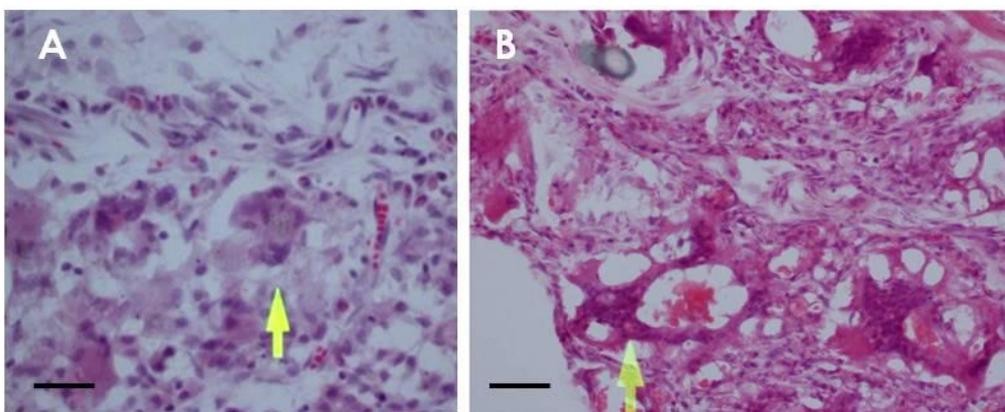


Figura 82: Presencia de células gigantes multinucleadas (flechas) en la fase de degradación del implante. Tinción de hematoxilina-eosina. Barra = 50 μ m (A v B).

En algunos animales se apreció la encapsulación del implante, que dio lugar a una mayor persistencia del mismo. En estos casos el infiltrado inflamatorio tenía características de inflamación aguda, en contraposición a otros animales con menor grado de persistencia del implante, ausencia de cápsula e inflamación crónica (figura 83).

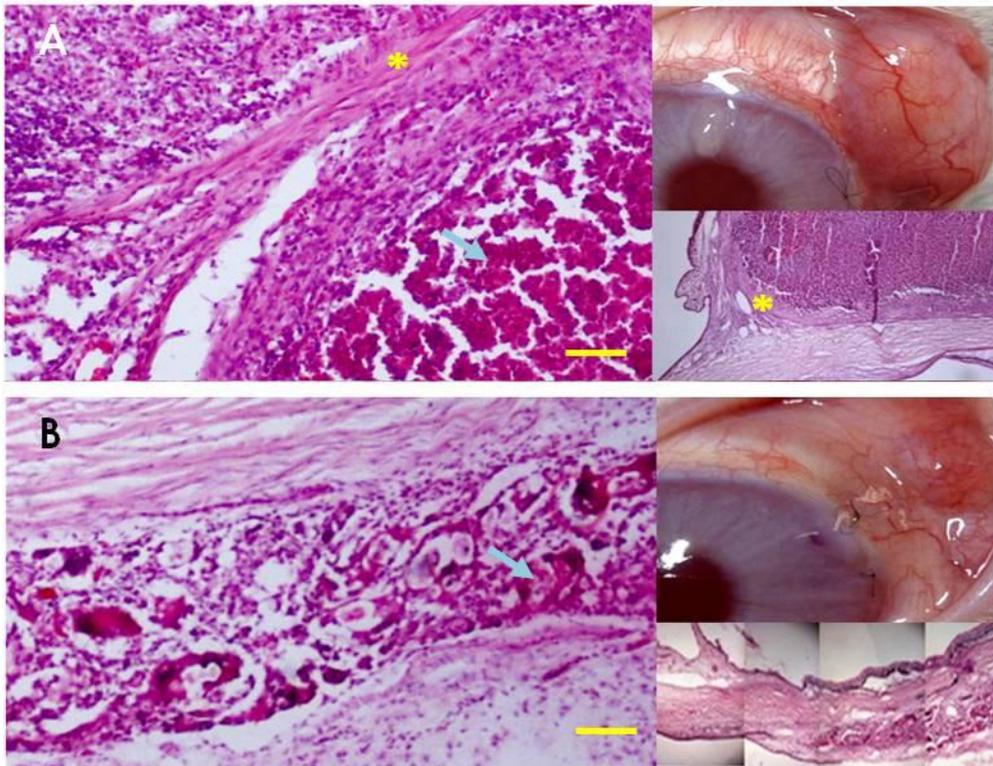


Figura 83: Implantes de PLGA. Resto de implante (flecha) rodeado de inflamación aguda y encapsulado (*) (A). Restos de implante rodeado por inflamación crónica y no encapsulado (B). Tinción de hematoxilina eosina. Barra = 50 μ m (A y B).

5.3.2. Persistencia del implante

El análisis histológico constató la permanencia del implante en el 95% de los ojos en los que se empleó (23 casos de 24 ojos, tabla 58). A pesar de que la persistencia del implante fue menor en los grupos 3 y 5, no se evidenciaron diferencias estadísticas entre los cuatro grupos con implante al respecto. Estas cifras de supervivencia del implante son superiores a las obtenidas mediante el análisis fotográfico (persistencia en 8 de 24 conejos: 33% de los casos).

Para facilitar el estudio de correlación entre PIO y persistencia del implante, elaboramos una clasificación basada en las fotografías histológicas realizadas (figura 84, tabla 58). En el grupo 3, se evidenció una correlación negativa significativa ($r_s = -0.956$; $P = 0,003$) entre el tamaño del implante y la PIO. Este hecho indica la existencia de un efecto espaciador del implante en este grupo, de forma que cuanto mayor cantidad de implante permanece, menor es la PIO obtenida.

El análisis conjunto de los conejos con implante cargado con fármacos (grupos 4, 5 y 7), evidenció una correlación positiva significativa entre la presencia del implante y la PIO ($r_s = 0,577$; $P = 0,012$) (figura 85). El análisis por grupos mostró que esta correlación era positiva en los tres grupos, de forma no significativa ($r_s = 0,67$; $r_s = 0,53$; $r_s = 0,73$ respectivamente) (figura 86). Este dato pone de manifiesto que, en estos grupos, la persistencia del implante estaría indicando una menor liberación o difusión tisular de los antimiotóticos, y una mayor PIO resultante. En estos casos el efecto hipotensor derivado del efecto espaciador del implante sería inferior al efecto hipertensor logrado por la persistencia del mismo.

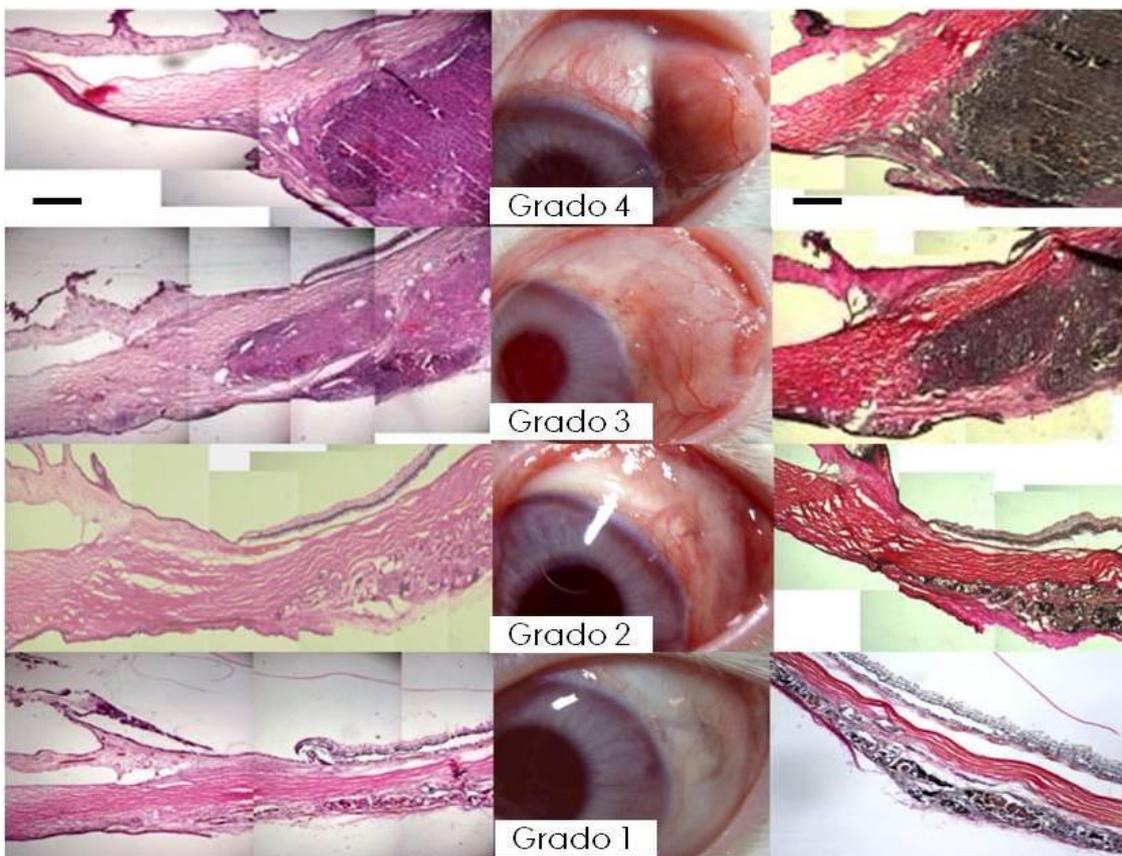


Figura 84: Grado de persistencia de implante. Tinción con hematoxilina-eosina (lado izquierdo) y Verhoeff (lado derecho). Barra = 50 μ m.

Tabla 58. Evaluación anatomopatológica de los ojos con implante

Grupo	Animal	Grado implante	Cápsula	Ampolla
Implante	1	4	-	-
	2	2	-	+
	3	1	-	-
	4	0	-	-
	5	1	-	+
	6	3	-	+
Implante (MMC+MMC)	1	2	-	-
	2	1	-	-
	3	2	-	-
	4	2	-	-
	5	4	+	-
	6	1	-	-
Implante (MMC+5-FU)	1	1	-	-
	2	1	-	-
	3	2	+	-
	4	2	-	-
	5	1	-	-
	6	1	-	-
Implante (MMC+Bevacizumab)	1	4	+	-
	2	1	-	+
	3	2	+	-
	4	4	+	-
	5	3	+	-
	6	1	+	-

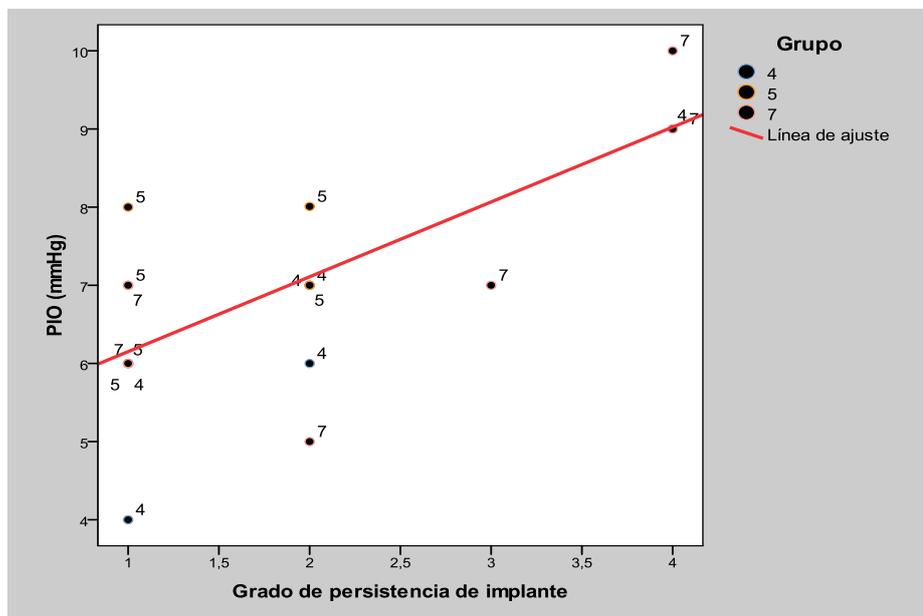


Figura 85: Gráfico de dispersión de puntos indicando correlación entre PIO al final del estudio (mmHg) y persistencia del implante (grado) en animales con implante con carga farmacológica. Las etiquetas muestran el grupo correspondiente (4, 5, 7). La línea roja es la línea de ajuste de la gráfica.

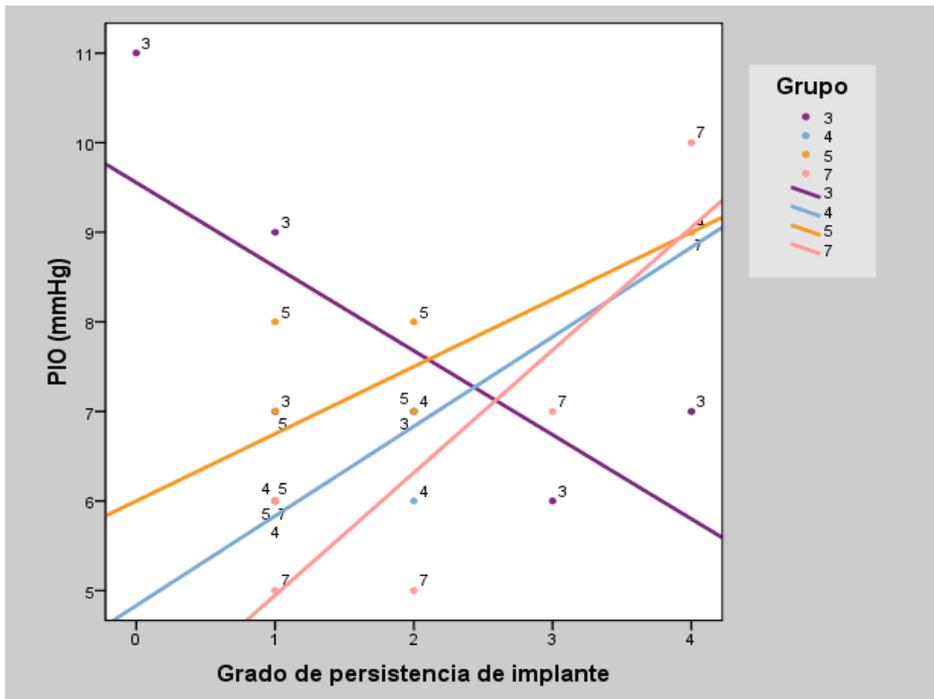


Figura 86: Gráfico de dispersión de puntos que indica la correlación PIO al final del estudio (mmHg) vs. persistencia del implante (grado). Las etiquetas muestran el grupo correspondiente (3, 4, 5, 7). Las líneas corresponden a la línea de tendencia de cada grupo.

5.3.3. Encapsulamiento del implante

Tal como se ha comentado en los apartados anteriores, algunos de los implantes evidenciaron la formación de una cápsula fibrosa así como de tractos fibrosos en el interior del implante (figura 85, tabla 58). Este hecho se dio principalmente en el grupo con MMC y bevacizumab (85% de los conejos).

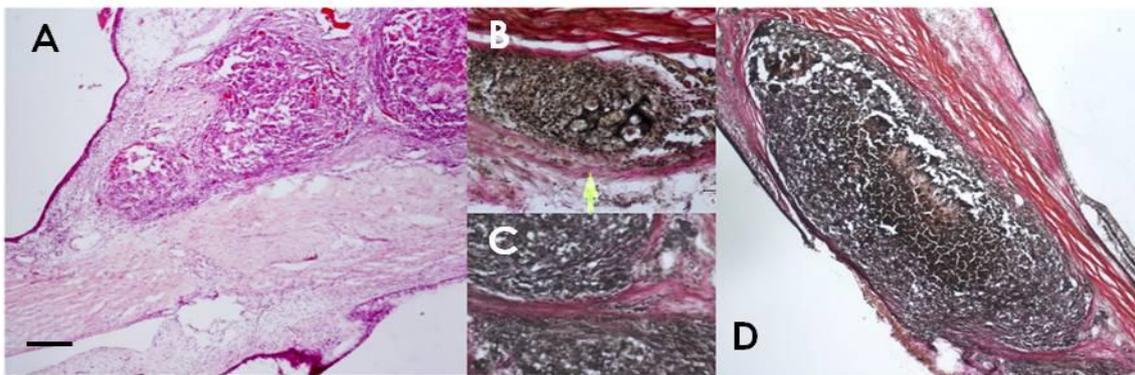


Figura 85: Encapsulamiento del implante. Tinción hematoxilina-eosina (A) v Verhoeff (B-D). Barra = 200 µm.

Discusión

1. DISCUSIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VITRO*

1.1. Estudios de citotoxicidad

En este trabajo, por diferentes motivos, hemos realizado estudios de citotoxicidad sobre dos líneas celulares: fibroblastos y epitelio conjuntival. Los fibroblastos epiesclerales son las células más implicadas en los procesos de fibrosis de la ampolla y fracaso quirúrgico. Este hecho, reportado en el conejo (Miller, et al., 1989), mono (Jampel, et al., 1988) y en el humano (Hitchings, et al., 1983), hace de ellos la principal célula diana de los antimetabólicos. El epitelio conjuntival es el tejido de la superficie ocular más próximo al lugar de aplicación del antimetabólico y, por lo tanto, más susceptible de daño. El empleo de esta línea celular obedece al estudio de la toxicidad epitelial inducida por estos fármacos. Al igual que ocurre con otros tejidos oculares, se han descrito cambios en el epitelio conjuntival durante el proceso de cicatrización tras cirugía filtrante. Sin embargo, se trataría de cambios de tipo colateral y no responsables del fracaso quirúrgico (Jampel, et al., 1988)

En los ensayos de citotoxicidad hemos analizado dos tiempos de incubación (1 y 3 días), que representarían la exposición puntual y prolongada al antimetabólico respectivamente. Previamente se han ensayado periodos de incubación más prolongados, que han sido descartados al comprobarse que el antimetabólico perdía efectividad al ser saturado por la proliferación celular.

El análisis de la citotoxicidad *in vitro* ha perseguido un cuádruple objetivo: elegir el antimetabólico más adecuado para encapsular, determinar la concentración idónea para la encapsulación y recubrimiento de los implantes, comprobar la integridad del principio activo tras su liberación y analizar la cinética de liberación del antimetabólico.

En lo que respecta al primer objetivo, nos hemos inclinado por la MMC, dada su mayor potencia y eficacia. La mayor inespecificidad de ésta en relación al 5-FU (afecta de forma similar a ambas líneas celulares), la hace potencialmente más tóxica sobre el epitelio conjuntival. Sin embargo, en el modelo empleado, no hemos evidenciado complicaciones a este respecto (ampollas isquémicas, fugas precoces o tardías de humor acuoso, etc.).

En cuanto a la determinación de la dosis de encapsulación y recubrimiento, hemos tenido en cuenta el efecto del antimetabólico principalmente sobre la línea SIRC. Con objeto de reducir la toxicidad, hemos empleado una concentración de MMC y 5-FU inferior a la DL_{50} de ambos fármacos.

En tercer lugar, los estudios de citotoxicidad realizados a partir de los implantes confirman la integridad de la MMC, que conserva su acción antimetabólica una vez liberada del implante.

Por último los ensayos de citotoxicidad revelan la liberación de MMC a lo largo de las 6 semanas del ensayo *in vitro*, con un pico de liberación inicial en los implantes no recubiertos y con una liberación constante cuando existe recubrimiento.

1.2. Microesferas e implantes de PLGA

El principal motivo para la elaboración de implantes consiste en el mantenimiento en el lecho quirúrgico de una concentración adecuada de antimetabólico que, sin producir un daño sobre los tejidos oculares, contrarreste la tendencia a la fibrosis, prolongando la supervivencia de la ampolla. El implante ideal debe de ser biocompatible, biodegradable y debe de tener una cinética de liberación tal que permita la acción del fármaco durante todo el proceso de cicatrización.

1.2.1. Elección del material

El PLGA es un polímero aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para la elaboración de suturas, dispositivos de liberación controlada y para la encapsulación de fármacos. Su biocompatibilidad se debe a que se hidroliza en monómeros de ácido glicólico y ácido láctico, los cuales son posteriormente eliminados por el ciclo de Krebs, con una mínima toxicidad sistémica asociada (figura 1) (Athanasίου, et al., 1996).

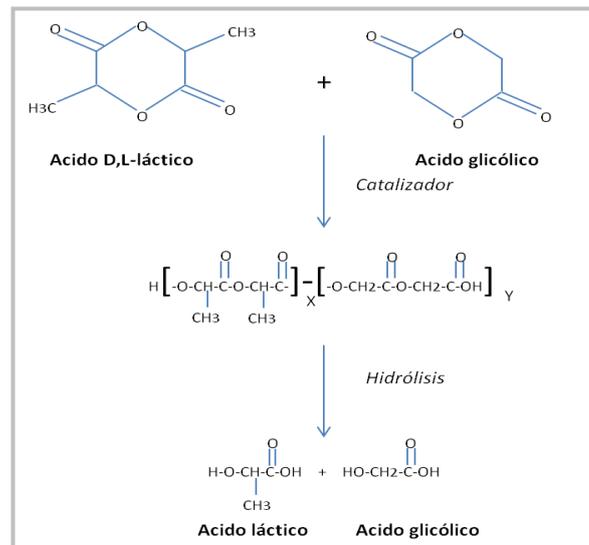


Figura 1: Síntesis e hidrólisis del PLGA

La degradación del PLGA se lleva a cabo por un proceso de hidrólisis no enzimática, que afecta de forma homogénea a toda la matriz del polímero. La tasa de degradación del PLGA está directamente relacionada con su hidrosolubilidad e inversamente relacionada con su cristalinidad. El incremento de la hidrosolubilidad posibilita un acortamiento de la vida media del PLGA, al facilitarse su hidrólisis. En nuestro caso, a pesar de que hubiéramos conseguido un incremento en la hidrosolubilidad aumentando la proporción de ácido glicólico en el implante, nos hemos inclinado por la proporción 50:50, porque es la que ofrece una menor cristalinidad. Se ha visto que esta proporción es la que permite una tasa de liberación más rápida del principio activo (Miller, et al., 1977). Existen otros factores determinantes de la degradación que no han sido considerados en este trabajo, como el tamaño y forma del implante, la naturaleza de los solventes empleados en su formulación, el grado de porosidad superficial, lugar de implantación y forma de esterilización.

Hemos descartado otros materiales por diferentes motivos:

- Los polianhídridos tienen la ventaja de ser biodegradables, sin embargo se han asociado a complicaciones como la dehiscencia de la herida quirúrgica, extrusión del implante e incremento en la incidencia de quistes de Tenon (Jampel, et al., 1990).

- Los vinilos (EVA y PVAc) tienen la desventaja de no ser biodegradables, si bien parecen ser inertes en el ojo del conejo y mono (Blandford, et al., 1992).
- El colágeno es biodegradable y biocompatible, de hecho se ha utilizado para la manufactura de implantes para la cirugía no perforante antiglaucomatosa (Aquaflo[®]). Sin embargo, su empleo como vehículo de 5-FU en monos y conejos se ha relacionado con una importante inflamación local (Hasty, et al., 1990, Finkelstein, et al., 1991).
- Los poliortoésteres son biodegradables, biocompatibles y, al ser hidrofóbicos, se erosionan lentamente en medio acuoso, dando lugar a una liberación sostenida de 5-FU, sin la fase rápida inicial típica del PLA y PLGA (Einmahl, et al., 2001). Su principal limitación consiste en que su tiempo de preparación es prolongado y el control de su peso molecular y cinética de liberación es bajo. Esta falta de reproducibilidad los hace poco aptos para su producción industrial como implantes, a diferencia del PLGA (Heller, et al., 2005).
- Los liposomas, estudiados como sistema de liberación de 5-FU, han permitido periodos de liberación subconjuntival del fármaco de 4 días (Simmons, et al., 1988). Trasladando estos resultados a nuestro modelo, se hubieran necesitado administraciones repetidas de liposomas para lograr un efecto terapéutico.
- El PLA se distingue del PLGA principalmente en el tiempo de degradación, más corto en el caso de este último. Ha sido empleado en la elaboración de microesferas de 5-FU en cirugía filtrante experimental en el conejo, ofreciendo buenos resultados en cuanto a formación de ampolla filtrante y reducción de la PIO. Sin embargo plantea el inconveniente de su persistencia a largo plazo (persistencia del 100% de los implantes al cabo de 90 días, en un modelo de cirugía filtrante), dando lugar a la encapsulación del implante (Cui, et al., 2008).

1.2.2. **Formulación de microesferas e implantes**

El PLGA ha sido empleado previamente en la manufactura de implantes para la liberación de antimetabólicos en modelos experimentales de cirugía filtrante.

Los trabajos realizados en los años 80-90 empleaban implantes fabricados por compresión de la mezcla del polímero y 5-FU (Gould, et al., 1991, Trope, et al., 1994, Hostyn, et al., 1995, Wang, et al., 1996). Más recientemente, el desarrollo de las técnicas de encapsulación ha permitido mejorar la liberación y protección del principio activo frente al ambiente. Así, en trabajos más recientes, los implantes están formados por la agregación de micropartículas (Lu, et al., 2000, Chiang, et al., 2001, Cui, et al., 2008).

El implante que hemos empleado en este estudio ha sido formulado por la agregación de micropartículas obtenidas mediante el método evaporación/extracción de solvente, a partir de una doble emulsión. Este método es muy eficiente para la encapsulación de principios activos hidrosolubles como la MMC. Tiene la ventaja de permitir modificar la cinética de liberación del fármaco en función de la cantidad y proporción de polímero empleado. No obstante, presenta limitaciones como la moderada eficiencia de encapsulación, la necesidad de emplear solventes tóxicos que pudieran afectar a la integridad del principio activo y la posibilidad de una liberación incompleta del mismo (Yeo, et al., 2001).

Mediante nuestra metodología hemos obtenido microesferas de 30-40 μm de diámetro. En el caso de haber utilizado nanopartículas ($< 1 \mu\text{m}$), estas podrían haber sido absorbidas por distintos tipos celulares y distribuidas por todo el organismo, ocasionando efectos adversos sistémicos. En nuestro caso buscábamos una acción local del fármaco en el mismo lugar que colocamos el implante, por lo que es más idóneo el empleo de partículas de mayor tamaño.

1.2.3. Radiación gamma

La esterilización mediante radiación gamma tiene la ventaja de evitar la humedad y el calentamiento excesivo, propios de la esterilización con vapor y de la formación de residuos tóxicos típicos del óxido de etileno. Su principal inconveniente es el posible deterioro del polímero, acortando su vida media (Athanasίου, et al., 1996). En el análisis morfológico del implante, con microscopía electrónica de barrido, se aprecian áreas de condensación del polímero que pudieran deberse a esta causa.

1.2.4. Caracterización de microesferas e implantes

1.2.4.1. Caracterización morfológica

El método de formulación de microesferas ha permitido obtener de forma reproducible micropartículas esféricas, de superficie lisa y con una distribución de tamaños homogénea. Al igual que han apuntado otros autores, la carga farmacológica ha ocasionado un ligero incremento en el tamaño de las microesferas (Zidan, et al., 2006).

Hemos obtenido, de forma sistemática, implantes constituidos por agregados de microesferas. A pesar de que se han detectado zonas de condensación en el análisis microscópico del implante, tanto los ensayos *in vitro* como *in vivo* han constatado su eficacia como vehículo de liberación de MMC. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de una liberación incompleta del citostático. De acuerdo con Cordeiro, con objeto de actuar sobre un área subconjuntival extensa, hemos diseñado un implante de mayor superficie que otros autores (Cordeiro, et al., 1997). Así, mientras en otros trabajos se han empleado implantes de 2,5 a 4 mm de diámetro, en este estudio hemos elaborado un implante de 5 mm. En lo que respecta al espesor, hemos aumentado las dimensiones (2,1 mm frente a 0,3 - 1,5 mm), con objeto de incrementar el efecto de espaciador subconjuntival (Trope, et al., 1994, Wang, et al., 1996, Cui, et al., 2008), a diferencia de otros autores que se han inclinado por implantes con forma de lámina (Yan, et al., 2011).

Al igual que ocurre con el tamaño, la morfología del implante guarda relación con sus resultados (Lee, et al., 1988). Hostyn ha reportado en el conejo una mayor tasa de inflamación conjuntival y extrusión al emplear implantes cilíndricos de PLGA que con implantes en forma de "C". En nuestro caso, dado que el implante corresponde a un *pellet*, presenta una morfología cóncavo-convexa, idónea para adaptarse a la curvatura escleral (Blandford, et al., 1992, Hostyn, et al., 1996).

1.2.4.2. Estudio de liberación del principio activo

El estudio de liberación de MMC se ha realizado mediante espectrofotometría indirecta sobre cultivos de células SIRC. Con esta metodología hemos podido

constatar, no sólo la integridad de la MMC tras su encapsulación, sino también el patrón de liberación del antimetabólico a partir de los implantes.

Tal como se desprende de los resultados, el análisis de los implantes cargados con MMC revela una cinética de liberación próxima al orden cero. Se trata de unos resultados óptimos, en los que se observa un perfil de liberación constante del citostático a lo largo de las 6 semanas de duración del ensayo *in vitro*. Estos resultados se superponen a los logrados por otros autores que han objetivado cinéticas de orden 0 mediante inyecciones de microesferas de PLA cargadas con adriamicina (Kimura, et al., 1992) o mediante implantes de PLGA cargados con 5-FU (Wang, et al., 1996). Llama la atención la ausencia de una fase de liberación inicial rápida (*burst*) del antimetabólico, característica típica de los implantes de PLA y PLGA (Trope, et al, 1994, Wang, et al., 1996, Chiang, et al., 2001, Yeo, et al., 2001). Normalmente estos polímeros dan lugar a una liberación bifásica (inicialmente rápida y posteriormente sostenida; cinética de orden uno), que es considerada poco conveniente para un implante desde el punto de vista terapéutico y económico (Yeo, et al., 2004). En la práctica existen diversas modificaciones del proceso de encapsulación que pueden favorecer la liberación constante en detrimento de la liberación bifásica (disminuir la solubilidad del PLGA en el solvente, incrementar la concentración de PLGA, incrementar la solubilidad del solvente en agua y aumentar la velocidad de eliminación del solvente). Es probable que una o varias de estas características hayan determinado la ausencia de liberación bifásica en nuestro estudio.

Hay que apuntar que en este trabajo no hemos realizado determinaciones del antimetabólico *in vivo* ni hemos realizado análisis de biodistribución ocular o sistémica del fármaco. Algunos autores, estudiando dispositivos de liberación de PLA o PLGA, han comparado los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, concluyendo que la duración del efecto *in vitro* es superior a *in vivo* (Kimura, et al., 1992, Wang, et al., 1996, Cui, et al., 2008). En nuestro trabajo podríamos afirmar que los implantes cargados y recubiertos con MMC liberarían el citostático durante al menos 6 semanas y darían lugar a un efecto hipotensor con una duración mínima de un mes tras la intervención. Por otro lado, al analizar las cifras tensionales del grupo 4 se observa que la mínima PIO se ha

obtenido en el día 7, y la mayor diferencia respecto al grupo control (ver resultados, gráfica 26) y respecto a los restantes grupos con implante se ha observado en el día 14 (ver resultados, apartado 4.1.3). Si tenemos en cuenta que el pico de liberación *in vitro* se ha obtenido en el día 21, podríamos concluir que la duración del efecto *in vitro* es superior a la del efecto *in vivo*, como afirman otros autores (Wang, et al., 1996, Cui, et al., 2008).

1.2.4.3. Eficiencia de encapsulación

Una de las limitaciones del sistema de evaporación/extracción de solvente como método de microencapsulación consiste en la ausencia de una elevada eficiencia de encapsulación. Este hecho es debido a la pérdida de principio activo durante los procesos de evaporación, emulsión y extracción de las microesferas. En nuestro caso hemos alcanzado unos valores de eficiencia de entre 47,6 y 64,3%, los cuales se superponen a los hallados por otros autores (Zidan, et al., 2006). No hemos analizado la contribución a estos resultados de diversos factores que podrían haber influido en la eficacia de encapsulación, tales como la carga de polímero y principio activo, la viscosidad del polímero y la cantidad de PVA y diclorometano.

2. DISCUSIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*

2.1. Modelo experimental

2.1.1. Animal de experimentación

El conejo albino New Zealand es, con diferencia, el animal más empleado en estudios en cirugía experimental antiglaucomatosa (Cordeiro, et al., 1997, Mead, et al., 2003, Esson, et al., 2004-a, Wong, et al., 2003 y 2005, Akyol, et al., 2005, Sherwood, 2006, Memarzadeh, et al., 2009, Li, et al., 2009, How, et al., 2010, Yan, et al., 2011). Entre sus ventajas se encuentran la facilidad de estabulación, manejo anestésico, quirúrgico y para la realización de revisiones periódicas, sin implicar un coste económico desorbitado. Además, la forma de cicatrización conjuntival tras trabeculectomía es reproducible y análoga a la del humano (fibrosis de la ampolla y cierre de la esclerotomía) (Miller, et al., 1989). Su principal inconveniente es la exagerada respuesta cicatricial frente al trauma quirúrgico, de forma que la cirugía filtrante, en ausencia de

tratamientos antiproliferativos asociados, tiende a fracasar en días o semanas (Miller, et al., 1989, Kimura, et al., 1992, Khaw, et al., 1993, Cordeiro, et al., 1997, Einmahl, et al., 2001, Wong, et al., 2003, Sherwood, et al., 2006, Yan, et al., 2011). Por ello, el ojo del conejo ha sido considerado idóneo para el estudio de la funcionalidad de la cirugía filtrante en condiciones de alto riesgo de fracaso, subsidiarias de tratamientos antimetabólicos. Además, esta rápida tendencia a la cicatrización posibilita un acortamiento significativo de los tiempos postoperatorios en comparación con el humano.

Diversos autores se han inclinado por otros animales como el mono, la rata y el ratón. Los monos tienen un ojo anatómicamente más próximo al del humano que los conejos (Bito, 1984, McGuigan, et al., 1987, Miller, et al., 1989). Además, si bien tienen mayor tendencia a la fibrosis que el humano, (Blandford, et al., 1992) expresan una respuesta inflamatoria de menor intensidad ante el trauma quirúrgico que el conejo. De hecho, éste último presenta una gran labilidad en la barrera hemato-acuosa, que se manifiesta por una mayor inflamación del segmento anterior ante un trauma ocular (Bito, 1984). Los inconvenientes principales de los monos radican en el coste económico (adquisición y mantenimiento de los animales) y manejo postoperatorio. Así, a diferencia de lo que ocurre en el conejo, los estudios en el mono precisan de anestesia general para las revisiones postoperatorias, con el consiguiente sesgo inducido por los anestésicos generales en la determinación de la PIO (Joseph, et al., 1988).

La cirugía filtrante experimental en muridos posibilita, por su menor coste, un incremento del tamaño muestral. Por el contrario, dado el menor tamaño del globo ocular y la mayor disparidad con la anatomía del humano, las técnicas quirúrgicas descritas difieren de las del humano en mayor medida que las del conejo. Básicamente, en estos animales la cirugía antiglaucomatosa consiste en la realización de una fistula escleral no controlada mediante una aguja, colocando opcionalmente una cánula entre la cámara anterior y el espacio subconjuntival (Sheridan, et al., 1996, Sherwood, et al., 2004, Seet, et al., 2010). Estos animales presentan la dificultad añadida de precisar, en la mayoría de los casos, anestesia general para las exploraciones postoperatorias.

2.1.2. Inducción de glaucoma

El estándar en los estudios de cicatrización tras cirugía filtrante consiste en la intervención de un ojo sano, sin una inducción previa de glaucoma. Esta situación tiene la ventaja de evitar los efectos iatrogénicos que pudiera tener sobre la anatomía ocular la inducción previa del glaucoma. Sin embargo, al intervenir ojos normotensos, se podría inhabilitar total o parcialmente la lectura de la PIO como parámetro para determinar el éxito-fracaso quirúrgico (McGuigan, et al., 1987). De hecho, en modelos experimentales de cirugía filtrante, algunos autores tienden a rechazar la PIO como criterio de funcionalidad de la cirugía, valorando únicamente la ampolla filtrante (Cordeiro, et al., 1997, Einmahl, et al., 2001, Mead, et al., 2003, Memarzadeh, et al., 2009). Cabría destacar que estos trabajos, exceptuando el último de ellos, emplean una técnica quirúrgica que difiere de la que planteamos en este estudio (ver apartado 2.1.4. de discusión: modelos alternativos). Otros autores consideran que la PIO superaría a la ampolla como parámetro de seguimiento, dada la gran variabilidad de esta última y la subjetividad en su medición (Lu, et al., 2000, Grisanti, et al., 2005). Por último, al igual que ocurre en la práctica en el humano, en algunos trabajos se reporta una persistencia en el efecto hipotensor de la cirugía, a pesar de la desaparición de la ampolla (Miller, et al., 1989, Trope, et al., 1994). En este estudio hemos considerado ambos parámetros, evidenciándose una correlación negativa entre ellos a lo largo del seguimiento.

Los únicos estudios experimentales que, en nuestro conocimiento, evalúan la trabeculectomía sobre ojos con glaucoma, han sido realizados en monos (McGuigan, et al., 1987, Jampel, et al., 1988 y 1990 y Nickells, et al., 2007). El método empleado ha sido el de la fotocoagulación de la malla trabecular. Según McGuigan la elevación artificial de la PIO añadiría sensibilidad en la detección del fracaso de la cirugía filtrante (McGuigan, et al., 1987). En nuestro caso, hemos descartado los monos por motivos económicos y de infraestructura. Por otra parte, si bien se han descrito diversos métodos de inducción de glaucoma en el conejo (Thorpe, et al., 1967, Sears, et al., 1974, Gherezghiher, et al., 1986), estos no han ofrecido resultados satisfactorios,

realizándose la mayor parte de los trabajos en este campo sobre rata y ratón (Johnson, et al., 2010).

2.1.3. Anestesia

El protocolo anestésico empleado en nuestro estudio es el más difundido en estudios similares realizados en el conejo, combinando anestésicos sistémicos (ketamina y xilacina) y tópicos (oxibuprocaina y tetracaína). Una de las ventajas del conejo frente a otros animales estriba en la posibilidad de empleo de anestesia tópica en las revisiones, evitando los efectos hipotensivos o hipertensivos inducidos por los anestésicos sistémicos. En el caso de la anestesia general realizada para la trabeculectomía, no podemos descartar un sesgo en la determinación de la PIO en el postoperatorio inmediato. De hecho, se ha reportado que la mezcla ketamina-xilacina induce un pico hipertensivo seguido de una hipotensión ocular, que se mantendría al cabo de 30 minutos de la inducción anestésica, momento en el que se determinó la PIO del postoperatorio inmediato (Ding, et al., 2011).

2.1.4. Trabeculectomía

La elección de la trabeculectomía como técnica quirúrgica se basa en el hecho de que es la técnica más extendida, no sólo a nivel experimental, sino en la práctica quirúrgica habitual en el humano. Entre las numerosas variantes técnicas descritas en el terreno experimental, se han seleccionado aquellas que son más próximas a nuestra práctica clínica en el humano:

- Localización de la cirugía

Al igual que la mayoría de los autores, hemos elegido los cuadrantes superiores, que son los más accesibles para la realización de la intervención, evitando la inserción muscular del recto superior.

- Colgajo conjuntival

A fin de acortar el tiempo quirúrgico, como reportan otros autores, hemos preferido realizar un colgajo conjuntival base en fornix (Trope, et al., 1994, Barton, et al., 2001, Shouman et al., 2006, Takeuchi, et al., 2009). El colgajo base en limbo requiere un cierre conjuntival más laborioso para mantener la

estanqueidad de la ampolla filtrante. No hemos realizado Tenonectomía, dada la escasa consistencia de la cápsula de Tenon en el conejo.

- Esclerotomía

En este estudio nos hemos inclinado por la realización de una trabeculectomía de espesor parcial o subescleral. Las dimensiones del flap escleral, (4x4 mm), así como de la trabeculectomía (1x3 mm), se han tomado en función de su frecuencia en la literatura al respecto (Charles, et al., 1991, Einmahl, et al., 2001, Polak, et al., 2008). Para contrarrestar la gran tendencia cicatricial de la conjuntiva del conejo, algunos autores recomiendan no suturar el *flap* (Grisanti, et al., 2005), o suturarlo de forma laxa (Chen, et al., 2006, Memarzadeh, et al., 2009). En nuestro caso, nos hemos inclinado por el segundo método, dado que una eventual dislocación del *flap* podría conllevar un incremento en la toxicidad farmacológica, máxime si tenemos en cuenta la localización del implante, adyacente a dicho *flap*.

En algunos casos se observó una posible vitreorragia al realizar la esclerotomía. Dada la ausencia de hipertensión ocular postoperatoria en estos casos, pensamos que, tal como describe Miller, no se trata de un prolapso vítreo real, sino de un cambio en la viscosidad del acuoso secundario a la rotura de la barrera hematoacuosa (Miller, et al., 1989).

- Localización del implante

De forma análoga a la mayoría de los autores, hemos colocado el implante en el espacio subconjuntival adyacente a la trabeculectomía (Lee, et al., 1988, Charles, et al., 1991, Trope, et al., 1994, Rabowsky, et al., 1996, Cui, et al., 2008). Dado que el proceso de cicatrización es principalmente local y subconjuntival, es en la zona de la intervención donde se precisa mayor efecto citostático. Esson ha evidenciado que, a diferencia de que lo que ocurre en la ampolla, a 180° de ésta, no se detectan picos de síntesis de mediadores de la cicatrización como el CTGF y TGFβ tras realizar una cirugía filtrante en el conejo (Esson, et al., 2004-a).

- Modelos alternativos

Algunos autores se inclinan por la realización de una esclerotomía sin *flap* escleral suprayacente (cirugía filtrante de espesor total) (Lee, et al., 1988, Kimura, et al., 1992, Oh, et al., 1994, Rabowsky, et al., 1996). Pensamos que esta técnica posibilita una mayor salida de humor acuoso en fases iniciales, sin embargo se trata de una técnica descartada en el humano dada su elevada tasa de complicaciones (hipotonía, atalamia, desprendimiento corioideo, etc.). Otros autores, según el modelo descrito por Cordeiro, implantan una cánula de 22 *gauge* que comunica la cámara anterior con el espacio subconjuntival (Cordeiro, et al., 1997, Barton, et al., 2001, Wong, et al., 2003). Dicha cánula es suturada con un punto de nylon 10/0 a la esclera. Esson, al comparar en el conejo la esclerotomía aislada o asociada a cánula concluye que la primera da lugar a una mayor síntesis de mediadores de cicatrización (CTGF y TGF β 2) (Esson, et al., 2004-a). En nuestro estudio descartamos el empleo de la cánula por diferentes motivos. En primer lugar, la necesidad de implantar un material extraño podría condicionar una mayor reacción inflamatoria que comprometiera la funcionalidad de la cirugía. En segundo lugar, la escasa amplitud de cámara anterior podría inducir la formación de catarata, que podría interferir en la funcionalidad de la técnica filtrante (Mead, et al., 2003).

- Lateralidad

Al igual que otros autores, hemos realizado intervenciones bilaterales, considerando un ojo como control (Kimura, et al., 1992, Oh, et al., 1994, Lu, et al., 2000, Chen, et al., 2006, Cui, et al., 2008, Li, et al., 2009). La realización de intervenciones unilaterales hubiera implicado la duplicación de los animales de estudio, lo cual habría sido imposible por razones económicas y de infraestructura. Uno de los inconvenientes de esta metodología consiste en el posible efecto de los fármacos antimetabólicos sobre el ojo adelfo, en virtud de su absorción sistémica. Sin embargo, en estudios realizados en conejo, se ha evidenciado que los niveles de 5-FU en acuoso equivalen al 3-7% de la cantidad de fármaco inyectada subconjuntivalmente en el ojo contralateral (Simmons, et al., 1988). Por ello pensamos que este hecho reviste escasa importancia en nuestro estudio. Por otra parte, ha existido una correlación

entre los valores basales de PIO de los ojos derechos con los ojos izquierdos ($r: 0,55; P = 0,001$), sin embargo esta correlación desaparece en el postoperatorio inmediato ($r: 0,2; P = 0,19$) lo cual indica que ambos ojos se pueden emplear de forma independiente.

- Pauta terapéutica postoperatoria

El protocolo terapéutico ha consistido en una aplicación única de midriático (tras la toma de PIO) y de la mezcla de antibiótico y corticoide. Esta pauta ha sido empleada en trabajos previos (Cordeiro, et al., 1997, Sherwood 2006, Memarzadeh, et al., 2009) y no ha reportado un incremento en la incidencia de complicaciones postoperatorias en comparación con pautas terapéuticas más prolongadas. Otros autores recomiendan emplear únicamente antibióticos, dado que los corticoides podrían prolongar la supervivencia de la cirugía, pudiendo interferir con otros fármacos en los resultados (Jampel, et al., 1990). En nuestro caso, no pensamos que una administración única de corticoide tópico pueda constituir un sesgo en la cicatrización.

2.1.5. Antimitóticos

La elección de los antimitóticos a evaluar se ha realizado atendiendo a criterios de experiencia (MMC y 5-FU) y novedad (bevacizumab). Hemos considerado la MMC como antimitótico a encapsular por tratarse de un fármaco potente e idóneo para un modelo de alto riesgo de fracaso quirúrgico. Exceptuando los implantes, la pauta de aplicación, así como la posología farmacológica utilizada, se han basado en la literatura disponible en trabajos similares al nuestro.

- 5-Fluorouracilo

La administración tópica intraoperatoria de 5-FU ha demostrado en el conejo una eficacia hipotensora superior a la de la vía subconjuntival postoperatoria (Doyle, et al., 1993). Además esta técnica reduce la incidencia de queratitis, al aplicarse el antimitótico bajo la conjuntiva, realizándose un posterior lavado. En el presente estudio, al igual que describen otros autores, hemos aplicado sobre la esclera una esponja empapada en 5-FU en su concentración comercial (50 mg/ml), durante 5 minutos (Khaw, et al., 1993 a y b, Oh, et al.,

1994, Einmahl, et al., 2001). Siguiendo las recomendaciones de Cordeiro (Cordeiro, et al., 1997), hemos empleado para tal fin un fragmento de esponja de 5x5 mm, tamaño superior al empleado por otros autores (Khaw, et al., 1993, Oh, et al., 1994, Einmahl, et al., 2001, Cui, et al., 2008).

- Mitomicina C

En este caso, siguiendo las recomendaciones de otros estudios, hemos empleado una concentración de 0,4 mg/ml, superior a la concentración estándar del humano (Khaw, et al., 1993 a y b, Oh, et al., 1994, Cordeiro, et al., 1997, Sherwood, 2006). El tiempo de aplicación, tamaño de esponja quirúrgica y área de aplicación, han sido los mismos que en el caso de 5-FU. A fin de elaborar los implantes, la concentración empleada de MMC ha sido de 1,04 µg/ml, como se desprende de los estudios de citotoxicidad sobre cultivos celulares (ver resultados, apartado 1.4.)

- Bevacizumab

Estudios previos han demostrado que el anti-VEGF humanizado expresa reacción cruzada con VEGF del conejo, al compartirse el 91% de la secuencia genética de este factor en ambas especies (Kinnunen, et al., 2006). La dosis (1,25 mg ó 0,05 ml de la solución comercial) y vía de administración (subconjuntival) se han adaptado de otros autores (Grewal, et al., 2008, How, et al., 2010). Dado que el pico de síntesis de VEGF se produce al cabo de 4 días de la cirugía filtrante y que la vida media del bevacizumab es de 4,88 días, es posible que su efecto sea a corto plazo. Por esta razón, algunos autores recomiendan las inyecciones subconjuntivales repetidas del anticuerpo en el postoperatorio (Memarzadeh, et al., 2009, How, et al., 2010, Van Bergen, et al., 2011). En nuestro estudio hemos preferido la administración única a fin de homogenizar la metodología con la de los grupos restantes de animales, ya que en ningún caso se administraron fármacos más allá del postoperatorio inmediato.

2.1.6. Evaluación clínica

El seguimiento clínico de los animales se ha basado, al igual que en otros estudios, en los valores de PIO y las características de la ampolla filtrante.

2.1.6.1. Medición de la presión intraocular

Los métodos más empleados para la medición de la PIO en el conejo han sido la tonometría Goldman (Einmahl, et al., 2001, Cui, et al., 2008), neumotonometría (Lee, et al., 1988, Charles, et al., 1991, Kimura, et al., 1992, Trope, et al., 1994, Cordeiro, et al., 1997), tonometría tipo Mackay-Marg (Tonopen ®) (Barton, et al., 2001, Wong, et al., 2005, Grisanti, et al., 2005, Sherwood, 2006, Yan, et al., 2011) y, recientemente, la tonometría de rebote (Tonovet ®) (Honjo, et al., 2007, Johnson, et al., 2010). En este trabajo, por motivos de familiaridad con el aparato, hemos empleado la tonometría de rebote. Este método ha evidenciado una reproducibilidad similar a la del Tonopen ® y una correlación con la tonometría Goldman, si bien, al igual que esta última, está influenciado por el espesor corneal (Kniestedt, et al., 2008). Con objeto de minimizar errores, todas las mediciones han sido tomadas por un mismo observador, de forma repetida, y en la misma franja horaria (de 10 a 12 horas) (Rowland, et al., 1981). Por falta de disponibilidad de paquímetro, no se han realizado mediciones del espesor corneal.

Al igual que en la mayoría de los estudios al respecto, hemos tenido en cuenta los valores absolutos de PIO. Otros autores, a fin de contrarrestar diferencias entre animales, se inclinan por analizar el porcentaje de reducción de la PIO más que el valor de ésta (Barton, et al., 2001, Chen, et al., 2006). En nuestro caso, al no existir diferencias entre grupos a nivel basal, creemos innecesario realizar esta modificación (ver apartado 4.1.2 de resultados).

2.1.6.2. Medición de la ampolla filtrante

Las características de la ampolla filtrante se han determinado en relación a fotografías de referencia, en base a la clasificación de Moorfields (Clarke 2003). Esta clasificación, descrita en el humano, ha sido empleada previamente en el conejo en ensayos sobre cirugía filtrante (Li, et al., 2009, How, et al., 2010, Van Bergen, et al., 2011). En el caso del conejo no es posible distinguir entre área central y máxima de ampolla filtrante, como indica esta clasificación. Por ello hemos señalado únicamente el área máxima de filtración. Hemos descartado otros métodos para el análisis de la ampolla, como la realización de mediciones *in situ* mediante calibres. Pensamos que

este último es un método muy subjetivo, poco reproducible y, al igual que el nuestro, precisa de la realización de gradaciones en algunos aspectos de la ampolla (vascularización, isquemia, etc.).

2.1.7. Análisis anatomopatológico

El principal objetivo del estudio histológico de este trabajo ha consistido en el análisis del implante. Para ello hemos realizado dos tinciones: Verhoeff y hematoxilina-eosina. La tinción de Verhoeff, encaminada principalmente al estudio de las fibras elásticas, distingue claramente entre el implante (negro) y el colágeno circundante (rojo). La tinción de hematoxilina-eosina está dirigida al estudio de la celularidad de la zona intervenida.

Hemos planteado un análisis transversal de todos los animales al final del estudio, para comprobar en este punto la funcionalidad de la cirugía y la persistencia del implante. Un análisis complementario a este hubiera consistido en el sacrificio y necropsia secuenciales de los animales, a fin de estudiar los cambios histológicos a lo largo del tiempo, como realizan otros autores (Blandford, et al., 1992, Kimura, et al., 1992, Einmahl, et al., 2001, Memarzadeh, et al., 2009). El inconveniente de este tipo de trabajos estriba en la imposibilidad de realizar estudios estadísticos al tener que fraccionar la muestra, resultando un tamaño muestral insuficiente.

2.2. Evaluación del grupo control

El grado de éxito de la trabeculectomía puede ser evaluado desde dos perspectivas: reducción de la PIO y formación y mantenimiento de la ampolla filtrante. En nuestro modelo experimental se ha observado que existe una correlación entre ambas variables a lo largo del seguimiento, por lo que ambas podrían ser válidas para realizar esta evaluación. No obstante, por diversos motivos, pensamos que la PIO es superior a la medida de la ampolla filtrante a este respecto. En primer lugar, la medida de la ampolla filtrante es más subjetiva. De hecho, únicamente hemos considerado su área de extensión, rechazando la altura y vascularización como criterios de éxito. En segundo lugar, en algunos animales la medición de la ampolla estaría sesgada por el efecto espaciador del implante.

- Efecto hipotensor ocular

Las cifras preoperatorias PIO de los ojos control han sido comparables a las reportadas por otros autores en el conejo albino, empleando la tonometría de rebote ($9,39 \pm 1,61$ mmHg en nuestro estudio, frente a 9 ± 1 mmHg) (Honjo, et al., 2010). En los ojos tratados farmacológicamente (grupos 1-7), los valores de PIO han sido similares ($8,83 \pm 1,56$ mmHg), no existiendo diferencias estadísticas con los controles.

Nuestro modelo de trabeculectomía ha permitido, en ausencia de tratamientos coadyuvantes, reducir la PIO en todos los momentos del postoperatorio, a excepción del día 14. Sin embargo, esta reducción ha sido estadísticamente significativa únicamente durante la primera semana. En términos de supervivencia de la cirugía, definido el fracaso como la recuperación de la PIO basal, nuestros resultados son comparables a los de otros autores (entre 7 y 11 días) (Einmahl, et al., 2001, Grisanti, et al., 2005). La forma de suturar el *flap* escleral no parece influir en el resultado quirúrgico. Así, mientras Grisanti logra unos resultados superponibles a los nuestros a pesar de no suturar el *flap*, Chen alcanza unos resultados superiores suturando el *flap* de forma laxa (20% de reducción de PIO al cabo de 2 semanas) (Grisanti, et al., 2005, Chen, et al., 2006).

- Formación de ampolla filtrante

El presente modelo experimental, teniendo en cuenta el área de ampolla como criterio de fracaso, ha determinado una tasa de supervivencia quirúrgica de 12,9 días, cifra intermedia en relación a los datos obtenidos por otros autores. Así, mientras algunos han reportado supervivencias en torno a 7-9 días (Lu, et al., 2000, Einmahl, 2001, Memarzadeh, et al., 2009), otros han logrado supervivencias más prolongadas, en torno a 19 días (Polak, et al., 2008). Hay que resaltar que en estos trabajos se ha utilizado un método más grosero en el análisis de la ampolla, destacando únicamente su presencia o ausencia, en lugar de la realización de una gradación de la misma, como en nuestro caso. Por otro lado, aquellos autores que han empleado la clasificación de Moorfields, han evidenciado unos resultados similares a los nuestros, observándose una persistencia de ampolla entre el 0-10% de los

casos al cabo de 20 días (Li, et al., How, et al.). No obstante, en ambos trabajos se empleó la técnica de la cánula de Cordeiro, que difiere de la nuestra, tal como se ha comentado previamente (discusión, apartado 2.1.4) (Cordeiro, et al., 1997). En lo que respecta a la vascularización conjuntival hemos detectado una hiperemia conjuntival en la ampolla durante las tres primeras semanas del postoperatorio y en la conjuntiva sana durante las dos primeras. Este hecho ha sido reportado previamente por otros autores, si bien con una duración menor (aproximadamente 1 semana) (Charles, et al., 1991, Grisanti, et al., 2005, Cui, et al., 2008). Hemos observado un caso de edema corneal transitorio, hallazgo descrito anteriormente, que no pensamos que haya influido en los resultados de la intervención (Einmahl, et al., 2001).

- Análisis anatomopatológico

La única diferencia encontrada en este estudio entre la conjuntiva bulbar sana y de la trabeculectomía ha consistido en una reducción de la población de células caliciformes secundaria a la intervención. Esta reducción, reportada previamente en otros estudios, sería más acentuada en las fases precoces del postoperatorio y se iría recuperando de forma paulatina, normalizándose a los 60 días de la intervención (Miller, et al., 1990, Sherwood, 2006). En el análisis de la esclerotomía, de forma similar que en otros trabajos, se aprecia su cierre cicatricial con depósito de colágeno (Lee, et al., 1988, Miller, et al., 1990, Honjo, et al., 2007). A diferencia de otros autores, no hemos realizado una gradación de la intensidad tincional de la zona, dado que no se trataba de uno de los objetivos de este estudio (Wong, et al., 2003 y 2006).

En algunos animales el análisis histológico ha revelado la existencia de una ampolla filtrante funcionante. De cualquier forma, la revisión de la literatura al respecto no esclarece las características anatomopatológicas de la ampolla filtrante. Mientras algunos autores la definen por la existencia de un lago intraescleral, otros lo hacen por la aparición de vacuolas subepiteliales o por el aumento en la laxitud estromal conjuntival (Mead, et al., 2003, Polak, et al., 2008).

2.3. Evaluación de los grupos de tratamiento

Los distintos tratamientos coadyuvantes empleados han dado lugar a diferentes resultados en cuanto a reducción de la PIO, formación de ampolla filtrante y análisis histopatológico. En general, todos ellos han superado los resultados tensionales obtenidos en los controles. Con respecto a la formación de ampolla, hecha la salvedad de los grupos con implante, también se han mejorado los resultados de los controles. La única excepción ha sido el bevacizumab subconjuntival que no ha superado las cifras de supervivencia quirúrgica de los controles con independencia del criterio de fracaso empleado.

2.3.1. Grupo mitomicina C tópica

- Efecto hipotensor ocular

Como era de esperar, la MMC ha permitido mejorar los resultados tensionales de la cirugía en todos los momentos del postoperatorio, a excepción del postoperatorio inmediato. El máximo efecto hipotensor se ha alcanzado en torno a la tercera semana del postoperatorio, fecha en la que ha demostrado ser el tratamiento más hipotensor de los estudiados. En términos de supervivencia de la intervención, según criterios tensionales, el grupo con MMC tópica ha sido superado únicamente por el grupo con implantes cargados y recubiertos con MMC. No hemos encontrado una explicación lógica para la elevación de la PIO en el postoperatorio inmediato de estos conejos. De cualquier forma, no parece que este hecho sesgue los resultados obtenidos a largo plazo.

- Formación de ampolla filtrante

La MMC ha ocasionado un incremento en el tamaño y duración de la ampolla filtrante con respecto a los controles. No en vano, se trata del grupo con mayor supervivencia quirúrgica de la ampolla, a excepción de los grupos con implante. Estos resultados son similares a los de Khaw, quien, con una pauta de MMC análoga a la nuestra, prolongó la supervivencia de la ampolla al tiempo que reducía la PIO de forma significativa. En cambio, otros autores, empleando la misma metodología de aplicación de MMC que en este trabajo, prolongaron de forma significativa la supervivencia de la ampolla sin reducir

de forma eficaz la PIO (Cordeiro, et al., 1997, Sherwood, 2006). Hay que reseñar que estos estudios difieren del nuestro en la técnica quirúrgica empleada, hecho que podría influir significativamente en los resultados.

Al igual que han reportado otros autores, se ha constatado la existencia de ampollas avasculares (Khaw, et al., 1993, Cordeiro, et al., 1997). Este hecho ha sido aislado (un solo caso) y transitorio, y no ha comportado complicaciones añadidas como escape de acuoso y endoftalmítis. De hecho, a lo largo del seguimiento no se han encontrado diferencias en cuanto al grado de hiperemia entre el grupo de MMC y el grupo control. Tampoco hemos evidenciado otras complicaciones corneales relacionadas con la MMC como la neovascularización y opacidad (Khaw, et al., 1993, Lu, et al., 2000). Así mismo, no hemos detectado casos de queratitis ni escape de humor acuoso aunque, en nuestro modelo, estas complicaciones podrían haber pasado desapercibidas por la falta de examen bajo fluoresceína.

- Análisis anatomopatológico

Desde un punto de vista histológico, el empleo de MMC ha ocasionado una reducción en el espesor epitelial conjuntival, si bien en menor grado que el reportado por Sherwood. No obstante, hay que destacar que este autor ha hallado estos resultados transcurridas únicamente dos semanas de la cirugía en lugar de un mes como en este trabajo, y en un solo animal de experimentación (Sherwood, 2006).

2.3.2. Grupo 5-Fluorouracilo tópico

- Efecto hipotensor ocular

El 5-FU tópico ha reducido la PIO en relación a los controles desde el día 5 hasta el final del estudio. Estos resultados se superponen a los que obtuvo Einmahl, empleando la misma metodología quirúrgica y de aplicación del citostático (Einmahl, et al., 2001). Otros autores han llegado a nuestras mismas conclusiones, a pesar de diferir en cuanto a la técnica quirúrgica y dosis de 5-FU (Cui, et al., 2008). Sin embargo Khaw, empleando una pauta antimetabólica similar a la del presente estudio, alcanzó unas reducciones tensionales de menor cuantía (Khaw, et al., 1993). En relación a los restantes grupos de

estudio, el 5-FU ha ofrecido unos resultados superiores a los del implante aislado y a los del bevacizumab subconjuntival, pero inferiores a los de la MMC tópica y en implante. En este caso, de forma análoga al grupo MMC tópica, las presiones del postoperatorio precoz han sido superiores que en los conejos control (Einmahl, et al., 2001).

- Formación de ampolla filtrante

A pesar de que el 5-FU ha permitido la formación de ampollas más extensas que en los controles, no lo ha hecho de forma significativa. Einmahl, en cambio, prolongó la supervivencia de la ampolla en el 83% de los animales al cabo de un mes de la intervención mediante la aplicación subconjuntival de POE cargados con 5-FU (Einmahl, et al., 2001).

En cuanto a las complicaciones, al igual que ocurría con la MMC, no hemos encontrado casos de edema corneal postoperatorio asociado al 5-FU, como reportan otros autores (Einmahl, et al., 2001, Cui, et al., 2008). Tal como describe Cui, la ampolla ha sido ligeramente más hiperémica al emplear 5-FU, al menos durante la primera semana del postoperatorio, igualándose a la de los controles al cabo de un mes (Cui, et al., 2008). En ninguno de los casos se han detectado ampollas avasculares, como ha sido descrito por otros autores (Doyle, et al., 1993, Khaw, et al., 1993).

En algunos trabajos se han empleado inyecciones subconjuntivales múltiples postoperatorias (Doyle, et al., 1993, Mead, et al., 2003, Memarzadeh, et al., 2009, How, et al., 2010). Pensamos que esta metodología es inferior a la nuestra por la posible iatrogenia inducida por las inyecciones y, en el caso de los tres primeros trabajos, por el lugar de administración del antimetabólico (a 180° de la ampolla). Además, en estos estudios no se evidenció una reducción significativa en la PIO con respecto a los controles (Doyle, et al., 1993, Mead, et al., 2003, Memarzadeh, et al., 2009) y, en lo que respecta a formación de ampolla filtrante, arrojaron resultados dispares. Mientras en algunos de ellos el 5-FU prolongaba la supervivencia de la ampolla (Doyle, et al., 1993, Mead, et al., 2003, How, et al., 2010), en otros la acortaba (Memarzadeh, et al., 2009).

- Análisis anatomopatológico

Histológicamente, los hallazgos han sido similares a los encontrados en el grupo anterior, observándose una reducción en el espesor del epitelio conjuntival.

2.3.3. Grupo implante

- Efecto hipotensor ocular

El empleo de implantes sin carga farmacológica ha permitido una mayor reducción de la PIO en las dos primeras semanas del postoperatorio, en comparación con el grupo control. Pensamos que este hecho se debe al efecto espaciador del implante, que actuaría retrasando la fibrosis subconjuntival.

- Formación de ampolla filtrante

La ampolla filtrante ha sido, así mismo, más prominente en este grupo que en los controles durante las tres primeras semanas. Probablemente en este resultado se sumen la existencia de una ampolla real y el efecto espaciador. Dado que el examen anatomopatológico se ha realizado al final del estudio, cuando apenas existía ampolla, en los puntos intermedios del estudio no podemos determinar qué parte de la elevación conjuntival corresponde a cada factor. Otros autores han alcanzado unos resultados similares empleando implantes sin carga a pesar de que sus estudios diferían del nuestro en cuanto a técnica quirúrgica y material del implante. Einmahl y Polak, estudiando la eficacia hipotensora de un implante de POE tras trabeculectomía, determinaron una mayor formación de ampolla y reducción de la PIO en los conejos con cirugía e implante que en los tratados únicamente con cirugía (Einmahl, et al., 2001, Polak, et al., 2008). Cui determinó una mayor eficacia en la formación de ampolla al estudiar un implante de PLA tras trabeculectomía en el conejo. En cambio no encontró diferencias entre implantes y controles en la reducción de la PIO (Cui, et al., 2008). Por último, Trope evidenció un mayor efecto hipotensor tras esclerotomía en conejos con implantes de PLGA que en los controles (Trope, et al., 1994).

Los conejos con implante han presentado una hiperemia conjuntival superior a la de los controles a lo largo de todo el seguimiento. Esta observación ha sido

reportada previamente en relación al PLA (Cui, et al., 2008). Esta hiperemia se ha manifestado no sólo a nivel de la ampolla, sino también en el resto de la conjuntiva bulbar. Este hallazgo se correlaciona con la inflamación tisular en torno al implante de PLGA evidenciada previamente en el conejo y cerdo (Gould, et al., 1994). Por otra parte, al igual que otros autores, no hemos encontrado complicaciones graves asociadas al implante de PLGA (extrusión del implante, necrosis escleral, etc.) (Gould, et al., 1994, Trope, et al., 1994). Sí hemos evidenciado un caso de migración limbar del mismo, que no ha comportado su extrusión ni un peor resultado tensional.

- **Análisis anatomopatológico**

El examen histopatológico ha puesto de manifiesto la existencia de una relación directa entre la persistencia de la ampolla filtrante y la reducción de la PIO. Así mismo, ha corroborado el efecto espaciador del implante, dado que la persistencia de éste se correlacionaba con la reducción tensional. Es interesante resaltar que en ninguno de estos casos se ha evidenciado la formación de una cápsula fibrosa en torno al implante, como ocurría en los restantes grupos con implante. Pensamos que la falta de carga farmacológica de estos implantes puede ser la causa del menor grado de reacción de cuerpo extraño en este grupo, a pesar de la persistencia del implante al final del estudio.

2.3.4. Grupo implante con mitomicina C, recubierto con mitomicina C

- **Efecto hipotensor ocular**

La aplicación mixta de MMC (encapsulada y en el recubrimiento del implante) ha demostrado ser el tratamiento de mayor eficacia hipotensora de los estudiados en este trabajo. Presumiblemente la MMC del recubrimiento del implante actuaría en la fase precoz del postoperatorio y sería sustituida por la MMC liberada por la degradación de las microesferas con el paso del tiempo. La potenciación de los resultados obtenidos al administrar de dos formas diferentes el mismo citostático, sería análoga a la descrita por Doyle en el caso de 5-FU (Doyle, et al., 1993). En términos de supervivencia de la cirugía en base a criterios tensionales, este grupo ha logrado los mejores resultados de todos los grupos estudiados.

- Formación de ampolla filtrante

Las dimensiones de la ampolla han sido, al igual que en los restantes grupos con implante, superiores a las de los conejos sin implante. Como se ha comentado previamente, no se puede descartar que la medición de esta variable sea artefactual debido al efecto espaciador del material interpuesto. La hiperemia de la ampolla ha sido superior que en los controles a lo largo del seguimiento. Sin embargo, la apariencia de la conjuntiva sana ha sido similar a la de éstos, a diferencia de lo que ocurre con el implante no cargado. Parece como si a este nivel, el efecto inflamatorio inducido por el PLGA fuera contrarrestado por la MMC. En uno de los conejos de este grupo se ha detectado una conjuntivitis presumiblemente irritativa, que ha cedido espontáneamente.

- Análisis anatomopatológico

En este grupo, al igual que en los restantes grupos con implante, se ha detectado la presencia de células gigantes multinucleadas. Se trata de células formadas por la fusión de macrófagos propias de la fase de reacción de cuerpo extraño frente a los implantes. Han sido identificadas previamente en relación con el PLGA (Gould, et al., 1994) y con otros materiales como el PLA (Kimura, et al., 1992), vinilos (Blandford, 1992) y poliortoésteres (Einmahl, et al., 2001). Por otro lado, de igual forma que ocurre con los grupos 5 y 7, en este grupo se ha observado una correlación entre persistencia del implante y PIO, de forma opuesta a lo que ocurre en el grupo precedente. Es probable que el encapsulamiento del implante determine su persistencia e impida en estos casos la difusión de su carga antimetabólica a los tejidos circundantes, con la consiguiente elevación tensional, tal como se evidenció en el conejo 5.

2.3.5. Grupo implante con mitomicina C, recubierto con 5-Fluorouracilo

- Efecto hipotensor ocular

La combinación de MMC y 5-FU ha reducido la PIO en relación a los controles a lo largo de todo el seguimiento, principalmente al cabo de un mes. No obstante, estos resultados han sido inferiores a los obtenidos cuando se ha empleado únicamente MMC (tópica o en implantes). Lu ha obtenido similares resultados al comparar micropartículas cargadas con 5-FU y recubiertas con

MMC frente a la MMC tópica aislada, si bien, cabría destacar que la dosis de MMC empleada en ambos grupos por este autor no ha sido equivalente (Lu, et al., 2000). Además, en nuestro trabajo se observa que la asociación MMC-5-FU no mejora los resultados tensionales obtenidos por el 5-FU en monoterapia. Estos resultados ponen de manifiesto la falta de sinergia entre 5-FU y MMC en nuestro modelo experimental. En este punto, nuestros resultados difieren de los de Lu, que ha reportado una mayor eficacia quirúrgica al asociar MMC a las partículas cargadas con 5-FU (Lu, et al., 2000).

- Formación de ampolla filtrante

La hiperemia de la ampolla ha sido superior a la de los conejos control durante todo el seguimiento, inferior a la del grupo de implante con MMC y bevacizumab, y similar a la de los restantes grupos con implante. Al igual que ocurre con el grupo precedente, la hiperemia de la conjuntiva sana ha sido menor que la que presentaban los conejos con implante sin antimetabólicos, pudiendo el 5-FU minimizar la inflamación inducida por el polímero. Las complicaciones detectadas (conjuntivitis y migración del implante) no parecen haber influido en los resultados de este grupo.

- Análisis anatomopatológico

En este grupo se ha observado la mayor tasa de degradación del implante al final del estudio, superior incluso a la del grupo con implante no cargado. Este hecho ha sido reportado previamente en relación, no sólo al PLGA (Gould, et al., 1994), sino también a los poliortoésteres (Einmahl, et al., 2001). Uniendo estos resultados a los del grupo anterior, podríamos decir que el 5-FU, a pesar de no potenciar los efectos hipotensores de la MMC, podría favorecer una menor inflamación, menor formación de cápsula y, por consiguiente, mayor degradación del implante. Gould encontró unos hallazgos similares, mediante la colocación de implantes subconjuntivales en el conejo y en el cerdo, si bien sin practicar una cirugía antiglaucomatosa concomitante (Gould, et al., 1994). Es un hecho aceptado que la duración de la fase de degradación de un implante depende principalmente de la tasa de degradación del polímero pero puede ser alterada por la citotoxicidad del principio activo que transporta (5-FU y MMC, en este caso) (Anderson, et al., 1997).

2.3.6. Grupo bevacizumab subconjuntival

- Efecto hipotensor ocular y formación de ampolla filtrante

La administración subconjuntival de bevacizumab ha ocasionado una reducción de la PIO al cabo de 1, 5, 14 y 28 días de la intervención. Sin embargo no se ha evidenciado un incremento en la formación de ampolla filtrante en relación a los controles. Estos resultados contrastan con los de otros autores, quienes, bien sea con inyecciones simples (Li, et al., 2009) o repetidas del fármaco (Memarzadeh, et al., 2009), han evidenciado una prolongación de la vida de la ampolla filtrante, no encontrando diferencias en cuanto a la PIO.

Se ha reportado previamente que la administración de este anticuerpo da lugar a la aparición de ampollas menos vascularizadas (Memarzadeh, et al., 2009, How, et al., 2010). En este trabajo, si bien la vascularización ha sido inferior en los conejos con bevacizumab en el postoperatorio precoz, no se han encontrado diferencias estadísticas entre ambos grupos a lo largo del seguimiento. El análisis de la hiperemia de la conjuntiva sana ha mostrado unos resultados paralelos a los de la conjuntiva de la ampolla.

- Análisis anatomopatológico

El examen anatomopatológico de este grupo ha revelado una importante desestructuración epitelial conjuntival, así como infiltración inflamatoria y fibrosis subepiteliales. Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Hilgert, que encontró un mayor depósito de colágeno al emplear bevacizumab que MMC tras cirugía filtrante en el conejo (Hilgert, et al., 2011). Sin embargo, contrastan con los hallazgos de Memarzadeh, quien evidenció una menor celularidad y depósito de colágeno al emplear este antiangiogénico (Memarzadeh, et al., 2009).

2.3.7. Grupo implante con mitomicina C y bevacizumab subconjuntival

- Efecto hipotensor ocular

El empleo de implantes con MMC y bevacizumab subconjuntival ha dado lugar a una reducción de la PIO a lo largo de todo el seguimiento en comparación con los controles, aunque únicamente al cabo de un mes lo ha

hecho de forma significativa. El patrón de reducción de la PIO, así como la supervivencia quirúrgica es similar al obtenido con implantes con MMC recubiertos por 5-FU. Lejos de existir una potenciación entre ambos fármacos, se evidencian unos resultados inferiores a los obtenidos cuando se emplea únicamente MMC, bien sea en forma tópica o encapsulada. El posible antagonismo entre ambos fármacos ha sido previamente descrito por otros autores, que reportaron en el conejo peores resultados en cuanto al grado de fibrosis al combinar MMC y bevacizumab que cuando emplearon únicamente MMC. Así mismo evidenciaron un menor grado de inhibición del VEGF al emplear MMC y bevacizumab, en comparación con el empleo aislado de bevacizumab (Hilgert et al., 2011). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Choi que describe una importante reducción tensional al combinar en el humano MMC tópica intraoperatoria y bevacizumab en una única inyección subconjuntival. Cabe destacar que este estudio representa una serie de casos, y no describe un grupo control de los mismos (Choi, et al., 2010).

- Formación de ampolla filtrante

En lo que respecta a la ampolla filtrante este grupo es el que presenta un mayor grado de hiperemia conjuntival a lo largo del seguimiento, no sólo a nivel de la ampolla sino también en la conjuntiva sana. Este hecho parece apoyar el antagonismo entre MMC y bevacizumab, dado que el grupo que presenta una menor hiperemia en la ampolla es el que emplea bevacizumab aislado. Por otra parte, si comparamos entre sí los grupos con implante, se aprecia que este grupo es el que presenta mayor altura y extensión de ampolla. Este hecho probablemente se debe a una mayor persistencia del implante en estos animales, más que a la formación de una ampolla funcionante. Otros autores, en cambio, han reportado efectos sinérgicos al combinar antimitóticos, si bien en estudios metodológicamente distintos al que planteamos. How, evidenció mejores resultados en cuanto a persistencia de la ampolla filtrante en el conejo al combinar 5-FU y bevacizumab que cuando empleó ambos de forma aislada (How, et al., 2010). Kahook logró, en humano, la formación de ampollas más difusas al combinar MMC tópica y ranibizumab intravítreo que cuando empleó únicamente MMC (Kahook, 2010). Sherwood

prolongó la supervivencia de la ampolla mediante una pauta secuencial de tratamientos antimitóticos (manosa 6-fosfato, anticuerpos anti CTGF e ilomastato) en relación al uso aislado de ilomastato, anticuerpos anti CTGF y TGF β y oligonucleótidos de sentido inverso frente al TGF β . Sin embargo, los resultados de la MMC intraoperatoria fueron superiores a los del tratamiento secuencial, si bien las ampollas obtenidas mediante este citostático fueron menos fisiológicas. Estos resultados serían compatibles con los obtenidos en este estudio, al tratarse en nuestro caso de un tratamiento simultáneo en lugar de secuencial (Sherwood, 2006).

- Análisis anatomopatológico

El estudio histológico de este grupo demuestra que esta combinación de fármacos se relacionaba con una mayor persistencia y encapsulamiento del implante. Parece lógico relacionar en estos casos el mayor tamaño de la ampolla, con el mantenimiento del implante. La correlación positiva con la PIO podría estar relacionada con la falta de difusión de los antimitóticos por efecto de la cápsula. Es probable que la reducción de la PIO a largo plazo se asocie con el comienzo de la desintegración de la cápsula, aunque sería necesario comprobar este dato con estudios más prolongados en el tiempo. De hecho, Gould evidenció un colapso en la cápsula a partir de la sexta semana de la colocación de un implante de PLGA en el espacio subconjuntival (Gould, et al., 1994).

Conclusiones

1. Los estudios de citotoxicidad realizados sobre cultivos celulares de epitelio y fibroblastos han revelado que la MMC es más idónea para encapsular que el 5-FU, determinando la concentración más adecuada para dicho proceso.
2. Hemos formulado, de forma reproducible, un implante por agregación de microesferas, capaz de encapsular eficientemente MMC y de liberarla de manera sostenida, a lo largo de las 6 semanas de duración del experimento *in vitro*, sin menoscabo en su actividad citostática.
3. La TBCT experimental en el ojo del conejo ha permitido disminuir la tensión ocular, así como favorecer la formación de ampolla filtrante. Ambas variables han mostrado una correlación a lo largo del seguimiento, demostrado ser válidas para evaluar el modelo experimental.
4. El empleo de implantes de PLGA sin carga farmacológica, debido a su efecto espaciador, ha incrementado la eficacia hipotensora de la TBCT en el postoperatorio inicial, sin aumentar la tasa de complicaciones.
5. Los implantes con MMC encapsulada y en el recubrimiento han logrado los mejores resultados quirúrgicos de los tratamientos evaluados, seguidos por la MMC tópica. Presumiblemente, el descenso inicial de la PIO derivaría del recubrimiento de MMC, y el descenso sostenido se debería a la degradación de las microesferas cargadas con el citostático.
6. El 5-FU tópico ha incrementado la tasa de éxito quirúrgico en el modelo estudiado, si bien en menor grado que la MMC tópica. El 5-FU, asimismo ha demostrado menor eficacia que la MMC como coadyuvante del implante cargado con MMC. No obstante podría favorecer la degradación precoz del PLGA, evitando la formación de una cápsula en torno al implante.
7. El bevacizumab subconjuntival en administración única aporta un escaso beneficio a la TBCT experimental. Su empleo como coadyuvante de los implantes de MMC disminuye la eficacia de éstos y podría estar relacionado con la persistencia y encapsulamiento del implante.

Bibliografía

- Akyol N**, Aydogan S, Akpolat N. Effects of membrane adhesion barriers on wound healing reaction after glaucoma filtration surgery: a comparative study with Interceed and Seprafilm. *Eur J Ophthalmol* 2005; 15: 591-7.
- Akyol N**, Akpolat N. Effects of intraoperative oxidated regenerated cellulose on wound healing reaction after glaucoma filtration surgery: a comparative study with Interceed and Surgicel. *Indian J Ophthalmol* 2008; 56: 109-14.
- Alm A**, Nilsson SF. Uveoscleral outflow - A review. *Exp Eye Res* 2009; 88: 760-8.
- Alpar JJ**. Sodium hyaluronate (Healon) in glaucoma filtering procedures. *Ophthalmic Surg* 1986; 17: 724-30.
- Amar N**, Labbé A, Hamard P, Dupas B, Baudouin C. Filtering blebs and aqueous pathway: an immunocytological and in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2008; 115: 1154-1161.
- Anand N**, Sahni K, Menage MJ. Modification of trabeculectomy with single-dose intraoperative 5-Fluorouracil application. *Acta Ophthalmol Scand* 1998; 76: 83-9.
- Andreanos D**, Georgopoulos GT, Vergados J, Papaconstantinou D, Liokis N, Theodossiadis P. Clinical evaluation of the effect of mitomycin-C in re-operation for primary open angle glaucoma. *Eur J Ophthalmol* 1997; 7: 49-54.
- Anderson JM**, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 28: 5-24.
- Apostolov VI**, Siarov NP. Subconjunctival injection of low-dose Mitomycin-C for treatment of failing human trabeculectomies. *Int Ophthalmol* 1996-1997; 20: 101-5.
- Araie M**, Shoji N, Shirato S, Nakano Y. Postoperative subconjunctival 5-fluorouracil injections and success probability of trabeculectomy in Japanese: results of 5-year follow-up. *Jpn J Ophthalmol* 1992; 36: 158-68.
- Araujo SV**, Spaeth GL, Roth SM, Starita RJ. A ten-year follow-up on a prospective, randomized trial of postoperative corticosteroids after trabeculectomy. *Ophthalmology* 1995; 102: 1753-9.
- ARVO**. The Association of Research in Vision and Ophthalmology. Statement for the use of animals in biomedical research. Animals in research committee. Second edition. Bethesda, 1993. www.arvo.org

- Athanasίου KA**, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic and copolymers. *Biomaterials* 1996; 17: 93-102.
- Azuara-Blanco A**, Katz LJ. Dysfunctional filtering blebs. *Surv Ophthalmol* 1998; 43: 93-126.
- Barton K**, Budenz DL, Khaw PT, Tseng SC. Glaucoma filtration surgery using amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1762-8.
- Becker B**. The decline in aqueous secretion and outflow facility with age. *Am J Ophthalmol* 1958; 46: 731-6.
- Bell RW**, Habib NE, O'Brien C. Long-term results and complications after trabeculectomy with a single per-operative application of 5-fluorouracil. *Eye* 1997; 11: 663-71.
- Bill A**, Phillips CI. Uveoscleral drainage of aqueous humour in human eyes. *Exp Eye Res* 1971; 12: 275-81.
- Bito LZ**. Species differences in the responses of the eye to irritation and trauma: a hypothesis of divergence in ocular defense mechanisms, and the choice of experimental animals for the eye research. *Exp Eye Res* 1984; 39: 807-29.
- Blandford DL**, Smith TJ, Brown JD, Pearson PA, Ashton P. Subconjunctival sustained release 5-fluorouracil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 3430-5.
- Broadway DC**, Grierson I, Stürmer J, Hitchings RA. Reversal of topical antiglaucoma medication effects on the conjunctiva. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 262-7.
- Bruno CA**, Eisengart JA, Radenbaugh PA, Moroi SE. Subconjunctival placement of human amniotic membrane during high risk glaucoma filtration surgery. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2006; 37: 190-7.
- Burgoyne CF**, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JK, Hart RT. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24: 39-73.
- Cairns JE**. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol* 1968; 66: 673-9.

- Cantor LB**, Mantravadi A, WuDunn D, Swamynathan K, Cortes A. Morphologic classification of filtering blebs after glaucoma filtration surgery: the Indiana Bleb Appearance Grading Scale. *J Glaucoma* 2003; 12: 266-71.
- CAT-152 0102 Trabeculectomy Study Group, Khaw P, Grehn F, Hollo G, Overton B, Wilson R, Vogel R, Smith Z. A phase III study of subconjunctival human anti-transforming growth factor beta (2) monoclonal antibody (CAT-152) to prevent scarring after first-time trabeculectomy. *Ophthalmology* 2007; 114: 1822-30.
- Charles JB**, Ganthier R Jr, Wilson MR, Lee DA, Baker RS, Leong KW, Glasgow BJ. Use of bioerodible polymers impregnated with mitomycin in glaucoma filtration surgery in rabbits. *Ophthalmology* 1991; 98: 503-8.
- Chen CW**, Huang HT, Bair JS, Lee CC. Trabeculectomy with simultaneous topical application of mitomycin-C in refractory glaucoma. *J Ocul Pharmacol* 1990; 6: 175-82.
- Chen HS**, Ritch R, Krupin T, Hsu WC. Control of filtering bleb structure through tissue bioengineering: An animal model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 5310-4.
- Chiang CH**, Tung SM, Lu DW, Yeh MK. In vitro and in vivo evaluation of an ocular delivery system of 5-fluorouracil microspheres. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001; 17: 545-53.
- Chihara E**, Dong J, Ochiai H, Hamada S. Effects of tranilast on filtering blebs: a pilot study. *J Glaucoma* 2002; 11: 127-33.
- Choi JY**, Choi J, Kim YD. Subconjunctival bevacizumab as an adjunct to trabeculectomy in eyes with refractory glaucoma: a case series. *Korean J Ophthalmol* 2010; 24: 47-52.
- Cillino S**, Di Pace F, Cillino G, Casuccio A. Biodegradable collagen matrix implants vs mitomycin-C as an adjuvant in trabeculectomy: a 24 month, randomized clinical trial. *Eye* 2011; 25: 1598-06.
- Clarke JCK**, Wells AP, Sangermani CD, Marks JR, Crowston JG, Peto T, Leung I, Khaw PT. A System for Grading Filtration Blebs Following Trabeculectomy. Presentation 1201. ARVO 2003. Ref Type: Abstract. www.blebs.net
- Coleman AL**, Hill R, Wilson MR, Choplin N, Kotas-Neumann R, Tam M, Bacharach J, Panek WC. Initial clinical experience with the Ahmed Glaucoma Valve implant. *Am J Ophthalmol* 1995; 120: 23-31.

- Cordeiro MF**, Constable PH, Alexander RA, Bhattacharya SS, Khaw PT. Effect of varying the mitomycin-C treatment area in glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1639-46.
- Cordeiro MF**, Gay JA, Khaw PT. Human anti-transforming growth factor-beta2 antibody: a new glaucoma anti-scarring agent. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2225-34.
- Cordeiro MF**, Bhattacharya SS, Schultz GS, Khaw PT. TGF-beta1, -beta2, and -beta3 in vitro: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 756-63.
- Cordeiro MF**, Mead A, Ali RR, Alexander RA, Murray S, Chen C, York-Defalco C, Dean NM, Schultz GS, Khaw PT. Novel antisense oligonucleotides targeting TGF-beta inhibit in vivo scarring and improve surgical outcome. *Gene Ther* 2003; 10: 59-71.
- Costa VP**, Comegno PE, Vasconcelos JP, Malta RF, José NK. Low-dose mitomycin C trabeculectomy in patients with advanced glaucoma. *J Glaucoma* 1996; 5:193-9.
- Cui LJ**, Sun NX, Li XH, Huang J, Yang JG. Subconjunctival sustained release 5-fluorouracil for glaucoma filtration surgery. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29: 1021-8.
- Daniels JT**, Cambrey AD, Occlleston NL, Garrett Q, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Khaw PT. Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1104-10.
- Dash AK**, Cudworth GC 2nd. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998; 40: 1-12.
- Demilly P**, Kretz G. Daunorubicin versus 5-fluorouracil in surgical treatment of primary open angle glaucoma: a prospective study. *Int Ophthalmol* 1992; 16: 367-70.
- Diestelhorst M**, Grisanti S. Photodynamic therapy to control fibrosis in human glaucomatous eyes after trabeculectomy: a clinical pilot study. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 130-4.
- Dietze PJ**, Feldman RM, Gross RL. Intraoperative application of 5-fluorouracil during trabeculectomy. *Ophthalmic Surg* 1992; 23: 662-5.

- Ding Ch**, Wang P, Tian N. Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model. *Exp Eye Res* 2011; 92: 512-20.
- Doyle JW**, Sherwood MB, Khaw PT, McGroarty S, Smith MF. Intraoperative 5-Fluorouracil for filtration surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 3313-19.
- Einmahl S**, Behar-Cohen F, D'Hermies F, Rudaz S, Tabatabay C, Renard G, Gurny R. A new poly (ortho ester)-based drug delivery system as an adjunct treatment in filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 695-700.
- Einmahl S**, Ponsart S, Bejjani RA, D'Hermies F, Savoldelli M, Heller J, Tabatabay C, Gurny R, Behar-Cohen F. Ocular biocompatibility of a poly (ortho ester) characterized by autocatalyzed degradation. *J Biomed Mater Res* 2003; 67: 44-53.
- Esson DW**, Neelakantan A, Iyer SA, Blalock TD, Balasubramanian L, Grotendorst GR, Schultz GS, Sherwood M. Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 485-91 (a).
- Esson DW**, Popp MP, Liu L, Schultz GS, Sherwood MB. Microarray analysis of the failure of filtering blebs in a rat model of glaucoma filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4450-62 (b).
- European Glaucoma Society (EUGS)**. Terminología y pautas para el glaucoma. 3ª ed. Savona Italia: Dogma Srl, 2008; 3: 119.
- Finkelstein I**, Trope GE, Heathcote JG, Rootman DS, Spero L, Menon IA. Further evaluation of collagen shields as a delivery system for 5-fluorouracil: histopathological observations. *Can J Ophthalmol* 1991; 26: 129-32.
- Five-year follow-up of the Fluorouracil Filtering Surgery Study. The Fluorouracil Filtering Surgery Study Group. *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 349-66.
- Fyodorov SN**, Kozlov VI, Timoshkina NT. Non-penetrating deep sclerectomy in open angle glaucoma. *Eye Microsurg* 1989; 1: 52-5.
- Gabhann F**, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* 2008; 15: 715-38.
- Gabelt BT**, Kaufman PL. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24: 612-37.
- Georgoulas S**, Dahlmann-Noor A, Brocchini S, Khaw PT. Modulation of wound healing during and after glaucoma surgery. *Prog Brain Res* 2008; 173: 237-54.

- Gherezghiher T**, March WF, Nordquist RE, Koss MC. Laser-induced glaucoma in rabbits. *Exp Eye Res* 1986; 43: 885-94.
- Gillies MC**, Brooks AM, Young S, Gillies B, Simpson JM, Goldberg I. A randomized phase II trial of interferon-alpha2b versus 5-fluorouracil after trabeculectomy. *Aust N Z J Ophthalmol* 1999; 27: 37-44.
- Goldenfeld M**, Krupin T, Ruderman JM, Wong PC, Rosenberg LF, Ritch R, Liebmann JM, Gieser DK. 5-Fluorouracil in initial trabeculectomy. A prospective, randomized, multicenter study. *Ophthalmology* 1994; 101: 1024-9.
- Gould L**, Trope G, Cheng YL, Heathcote JG, Sheardown H, Rootman D, Liu GS, Menon IA. Fifty:fifty (DL glycolic acid-lactic acid) copolymer as a drug delivery system for 5-fluorouracil: a histopathological evaluation. *Can J Ophthalmol* 1994; 29: 168-171.
- Gressel MG**, Parrish RK 2nd, Folberg R. 5-fluorouracil and glaucoma filtering surgery: I. An animal model. *Ophthalmology* 1984; 91: 378-83.
- Grewal DS**, Jain R, Kumar H, Grewal SP. Evaluation of subconjunctival bevacizumab as an adjunct to trabeculectomy a pilot study. *Ophthalmology* 2008; 115: 2141-45.
- Grierson I**, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye* 1987; 1: 204-10.
- Grisanti S**, Diestelhorst M, Heimann K, Kriegelstein G. Cellular photoablation to control postoperative fibrosis in a rabbit model of filtration surgery. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 1353-9.
- Grisanti S**, Szurman P, Warga M, Kaczmarek R, Ziemssen F, Tatar O, Bartz-Schmidt KU. Decorin modulates wound healing in experimental glaucoma filtration surgery: a pilot study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 191-6.
- Hasty B**, Heuer DK, Minckler DS. Primate trabeculectomies with 5-fluorouracil collagen implants. *Am J Ophthalmol* 1990; 109: 721-5.
- Heller J**. Ocular delivery using poly (ortho esters). *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 2053-62.
- Herschler J**, Claflin AJ, Fiorentino G. The effect of aqueous humor on the growth of subconjunctival fibroblasts in tissue culture and its implications for glaucoma surgery. *Am J Ophthalmol* 1980; 89: 245-9.
- Herschler J**. Long-term results of trabeculectomy with collagen sponge implant containing low-dose antimetabolite. *Ophthalmology* 1992; 99: 666-70.

- Heuer DK**, Parrish RK 2nd, Gressel MG, Hodapp E, Palmberg PF, Anderson DR. 5-fluorouracil and glaucoma filtering surgery. II. A pilot study. *Ophthalmology* 1984; 91: 384-94.
- Heuer DK**, Parrish RK 2nd, Gressel MG, Hodapp E, Desjardins DC, Skuta GL, Palmberg PF, Nevárez JA, Rockwood EJ. 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. III. Intermediate follow-up of a pilot study. *Ophthalmology* 1986; 93: 1537-46
- Hilgert CR**, Hilgert AH, Odashiro PR, Odashiro AN, Paranhos A. Lack of bevacizumab antiangiogenic effect when used combined with mitomycin C in glaucoma filtration surgery in the rabbit: histopathological and immunohistochemical analyses. ARVO 2011, abstract 577.
- Hitchings RA**, Grierson I. Clinicopathological correlation in eyes with failed fistulizing surgery. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1983; 103: 84-8.
- Honjo M**, Tanihara H, Kameda T, Kawaji T, Yoshimura N, Araie M. Potential role of Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 in glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 5549-57.
- Hostyn P**, Villain F, Malek-Chehira N, Kühne F, Takeuse Y, Parrish II RK, Parel JM. Implant biodegradable à liberation contrôlée de 5-FU dans la chirurgie du glaucoma. *J Fr Ophtalmol* 1996; 2: 133-39.
- How A**, Leng Leng Chua J, Charlton A, Su R, Lim M, Kumar RS, Crowston JG, Wong TT. Combined treatment with bevacizumab and 5-fluorouracil attenuates the postoperative scarring response after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 928-32.
- Jampel HD**, McGuigan LJ, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Quigley HA. Cellular proliferation after experimental glaucoma filtration surgery. *Arch Ophthalmol* 1988;106: 89-94.
- Jampel HD**, Leong KW, Dunkelburger GL, Quigley HA. Glaucoma filtration surgery in monkeys using 5-fluorouridine in polyanhydride disks. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 430-35.
- Johnson M**, Shapiro A, Ethier CR, Kamm RD. Modulation of outflow resistance by the pores of the inner wall endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:1670-5.
- Johnson M**. 'What controls aqueous humour outflow resistance?'. *Exp Eye Res.* 2006; 82: 545-57.

- Johnson TV**, Tomarev SI. Rodent models of glaucoma. *Brain Res Bull* 2010 15; 81: 349-58.
- Jordan JF**, Diestelhorst M, Grisanti S, Kriegelstein GK. Photodynamic modulation of wound healing in glaucoma filtration surgery. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 870-5.
- Joseph JP**, Miller MH, Hitchings RA. Wound healing as a barrier to successful filtration surgery. *Eye* 1988; 2 (Suppl): S113-S123.
- Kahook MY**. Bleb morphology and vascularity after trabeculectomy with intravitreal ranibizumab: a pilot study. *Am J Ophthalmol* 2010; 150: 399-03.
- Kass MA**, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK 2nd, Wilson MR, Gordon MO. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 701-13.
- Khaw PT**, Ward S, Grierson I, Rice NSC. Effect of beta radiation on proliferating human Tenon's capsule fibroblasts. *Br J Ophthalmol* 1991; 75: 580-3.
- Khaw PT**, Ward S, Porter A, Grierson I, Hitchings RA, Rice NS. The long-term effects of 5-fluorouracil and sodium butyrate on human Tenon's fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 2043-52 (a).
- Khaw PT**, Sherwood MB, Doyle JW, Smith MF, Grierson I, McGorray S, Schultz GS. Intraoperative and postoperative treatment with 5-fluorouracil and mitomycin-c: long term effects in vivo on subconjunctival and scleral fibroblasts. *Int Ophthalmol* 1992; 16: 381-5 (b).
- Khaw PT**, Sherwood MB, MacKay SL, Rossi MJ, Schultz G. Five-minute treatments with fluorouracil, floxuridine, and mitomycin have long-term effects on human Tenon's capsule fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 1150-4 (c).
- Khaw PT**, Doyle JW, Sherwood MB, Grierson I, Schultz G, McGorray S. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 263-7 (a).
- Khaw PT**, Doyle JW, Sherwood MB, Smith MF, McGorray S. Effects of intraoperative 5-fluorouracil or mitomycin C on glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Ophthalmology* 1993 ; 100 : 367-72 (b).
- Khaw PT**, Occeleston NL, Schultz G, Grierson I, Sherwood MB, Larkin G. Activation and suppression of fibroblast function. *Eye* 1994; 8: 188-95.

- Kimura H**, Ogura Y, Moritera T, Honda Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Injectable microspheres with controlled drug release for glaucoma filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 3436-41.
- Kinnunen K**, Korpisalo P, Rissanen TT, Heikura T, Viita H, Uusitalo H, Ylä-Herttuala S. Overexpression of VEGF-A induces neovascularization and increased vascular leakage in rabbit eye after intravitreal adenoviral gene transfer. *Acta Physiol (Oxford)* 2006; 187: 447-57.
- Kirwan JF**, Rennie C, Evans JR. Beta radiation for glaucoma surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 2: CD003433.
- Kniestedt Ch**, Punjabi O, Lin S, Stamper RL. Tonometry through the ages. *Surv Ophthalmol* 2008; 53: 568-91.
- Kozlov VI**, Bagrov SN, Anisimova SY. Non-penetrating deep sclerectomy with collagen. *Eye Microsurg* 1990; 3: 44-6.
- Krasnov MM**. Externalization of Schlemm's canal (sinusotomy) in glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1968; 52: 157-61.
- Krupin T**, Podos SM, Becker B, Newkirk JB. Valve implants in filtering surgery. *Am J Ophthalmol* 1976; 81: 232-5.
- Lama PJ**, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2003; 48: 314-46.
- Leask A**, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004; 18: 816-27.
- Lee DA**, Flores RA, Anderson PJ, Leong KW, Teekhasaene C, de Kater AW, Hertzmark E. Glaucoma filtration surgery in rabbits using bioerodible polymers and 5-fluorouracil. *Ophthalmology* 1987; 94: 1523-30.
- Lee DA**, Leong KW, Panek WC, Eng CT, Glasgow BJ. The use of bioerodible polymers and 5-fluorouracil in glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29: 1692-97.
- Lee DA**, Lee TC, Cortes AE, Kitada S. Effects of mithramycin, mitomycin, daunorubicin, and bleomycin on human subconjunctival fibroblast attachment and proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 2136-44.
- Leske MC**, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E; Early Manifest Glaucoma Trial Group. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 48-56.

- Li Z**, Van Bergen T, Van de Veire S, Van de Vel I, Moreau H, Dewerchin M, Maudgal PC, Zeyen T, Spileers W, Moons L, Stalmans I. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 5217-25.
- Lopes JF**, Moster MR, Wilson RP, Altangerel U, Alvim HS, Tong MG, Fontanarosa J, Steinmann WC. Subconjunctival sodium hyaluronate 2.3% in trabeculectomy: a prospective randomized clinical trial. *Ophthalmology* 2006; 113: 756-60.
- Lu DW**, Chang CJ, Chiang CH, Yeh MK, Chou PI. Wound modulation after trabeculectomy by different formulations of antimetabolites in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000; 16: 529-38.
- Lütjen-Drecoll E**, Shimizu T, Rohrbach M, Rohen JW. Quantitative analysis of 'plaque material' in the inner and outer wall of Schlemm's canal in normal- and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 1986; 42: 443-55.
- Mäepea O**, Bill A. Pressures in the juxtacanalicular tissue and Schlemm's canal in monkeys. *Exp Eye Res* 1992; 54: 879-83.
- Mardelli PG**, Lederer CM Jr, Murray PL, Pastor SA, Hassanein KM. Slit-lamp needle revision of failed filtering blebs using mitomycin C. *Ophthalmology* 1996; 103: 1946-55.
- Martini E**, Laffi GL, Sprovieri C, Scorolli L. Low-dosage mitomycin C as an adjunct to trabeculectomy. A prospective controlled study. *Eur J Ophthalmol* 1997; 7: 40-8.
- McEwen WK**. Application of Poiseuille's law to aqueous outflow. *Arch Ophthalmol* 1958; 60: 290-4.
- McGuigan LJ**, Mason RP, Sanchez R, Quigley HA. D-penicillamine and beta-aminopropionitrile effects on experimental filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987; 28:1625-9.
- Mead AL**, Wong TT, Cordeiro MF, Anderson IK, Khaw PT. Evaluation of anti-TGF-beta2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 3394-401.
- Memarzadeh F**, Varma R, Lin LT, Parikh JG, Dustin L, Alcaraz A, Elliott D. Postoperative use of bevacizumab as an antifibrotic agent in glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 3233-7.
- Meyer-Ter-Vehn T**, Gebhardt S, Sebald W, Buttman M, Grehn F, Schlunck G, Knaus P. p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast

transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1500-9.

Meyer-Ter-Vehn T, Katzenberger B, Han H, Grehn F, Schlunck G. Lovastatin inhibits TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 3955-60.

Mietz H, Krieglstein GK. Suramin to enhance glaucoma filtering procedures: a clinical comparison with mitomycin. *Ophthalmic Surg Lasers* 2001; 32: 358-69.

Miller MH, Grierson I, Unger WI, Hitchings RA. Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. *Ophthalmic Surg* 1989; 20: 350-357.

Miller MH, Grierson I, Unger WG, Hitchings RA. The effect of topical dexamethasone and postoperative beta irradiation on a model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. *Ophthalmic Surg* 1990; 21: 44-54.

Miller RA, Brady JM, Cutright DE. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J Biomed Mater Res* 1977; 11: 711-9.

Molteno AC. New implant for drainage in glaucoma. Clinical trial. *Br J Ophthalmol* 1969; 53: 606-15.

Molteno AC, Straughan JL, Ancker E. Long tube implants in the management of glaucoma. *S Afr Med J* 1976; 50:1062-6.

Nakamura H, Siddiqui SS, Shen X, Malik AB, Pulido JS, Kumar NM, Yue BY. RNA interference targeting transforming growth factor-beta type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol Vis* 2004; 10: 703-11.

Nickells RW, Schlamp CL, Li Y, Kaufman PL, Heatley G, Peterson JC, Faha B, Ver Hoeve JN. Surgical lowering of elevated intraocular pressure in monkeys prevents progression of glaucomatous disease. *Exp Eye Res* 2007; 84: 729-36.

Oh SY, Youn, DH, Kim DM, Hong Ch. The effects of intraoperative mitomycin-C or 5-fluorouracil on glaucoma filtering surgery. *Korean J Ophthalmol* 1994; 8: 6-13.

Olthoff CM, Schouten JS, van de Borne BW, Webers CA. Noncompliance with ocular hypotensive treatment in patients with glaucoma or ocular hypertension an evidence-based review. *Ophthalmology* 2005; 112: 953-61.

Ophir A, Ticho U. Encapsulated filtering bleb and subconjunctival 5-fluorouracil. *Ophthalmic Surg* 1992; 23: 339-41.

- Oshima Y**, Sakamoto T, Nakamura T, Tahara Y, Goto Y, Ishibashi T, Inomata H. The comparative benefits of glaucoma filtering surgery with an electric-pulse targeted drug delivery system demonstrated in an animal model. *Ophthalmology* 1999; 106: 1140-6.
- Peng Y**, Ang M, Foo S, Lee WS, Ma Z, Venkatraman SS, Wong TT. Biocompatibility and biodegradation studies of subconjunctival implants in rabbit eyes. *PLoS One* 2011; 6: e22507.
- Picht G**, Grehn F. Classification of filtering blebs in trabeculectomy: biomicroscopy and functionality. *Curr Opin Ophthalmol* 1998; 9: 2-8.
- Polak MB**, Valamanesh F, Felt O, Torriglia A, Jeanny JC, Bourges JL, Rat P, Thomas-Doyle A, BenEzra D, Gurny R, Behar-Cohen F. Controlled delivery of 5-chlorouracil using poly(ortho esters) in filtering surgery for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 2993-3003.
- Quigley HA**. The number of persons with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 1996; 80: 389-393.
- Rabowsky JH**, Dukes AJ, Lee DA, Leong KW. The use of bioerodible polymers and daunorubicin in glaucoma filtration surgery. *Ophthalmology* 1996; 103: 800-7.
- Resnikoff, S**, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti, S. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 844-851.
- Rowland JM**, Potter DE, Reiter RJ. Circadian rhythm in intraocular pressure: a rabbit model. *Curr Eye Res* 1981; 1: 169-73.
- Ruderman JM**, Welch DB, Smith MF, Shoch DE. A randomized study of 5-fluorouracil and filtration surgery. *Am J Ophthalmol* 1987; 104: 218-24.
- Schiller M**, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 2004; 35: 83-92.
- Sears D**, Sears M. Blood-aqueous barrier and alpha-chymotrypsin glaucoma in rabbits. *Am J Ophthalmol* 1974; 77: 378-83.
- Seet LF**, Su R, Barathi VA, Lee WS, Poh R, Heng YM, Manser E, Vithana EN, Aung T, Weaver M, Sage EH, Wong TT. SPARC deficiency results in improved surgical survival in a novel mouse model of glaucoma filtration surgery. *PLoS ONE* 2010; 5 (2): e9415.

- Sheridan CM**, Unger WG, Ayliffe W, Alam Y, Goldsmith J, O'Donoghue E, McLeod D. Macrophages during fibrosis following scleral fistulising surgery in a rat model. *Curr Eye Res.* 1996; 15: 559-68.
- Sherwood MB**, Esson DW, Neelakantan A, Samuelson DA. A new model of glaucoma filtering surgery in the rat. *J Glaucoma* 2004; 13: 407-412.
- Sherwood MB**. A sequential, multiple-treatment, targeted approach to reduce wound healing and failure of glaucoma filtration surgery in a rabbit model (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; 104: 478-92.
- Shin DH**, Juzych MS, Khatana AK, Swendris RP, Parrow KA. Needling revision of failed filtering blebs with adjunctive 5-fluorouracil. *Ophthalmic Surg* 1993; 24: 242-8.
- Shive MS**, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 28: 5-24.
- Shouman AA**, Helal A, Marzouk MA, Zaki EM. Methylcellulose, a healing inhibitor factor in an animal model of trabeculectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2515-9.
- Sidoti PA**, Choi JC, Morinelli EN, Lee PP, Baerveldt G, Minckler DS, Heuer DK. Trabeculectomy with intraoperative 5-fluorouracil. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29: 552-61.
- Simmons ST**, Sherwood MB, Nichols DA, Penne RB, Sery T, Spaeth GL. Pharmacokinetics of a 5-fluorouracil liposomal delivery system. *Br J Ophthalmol* 1988; 72: 688-91.
- Skuta GL**, Assil K, Parrish RK 2nd, Folberg R, Weinreb RN. Filtering surgery in owl monkeys treated with the antimetabolite 5-fluorouridine 5'-monophosphate entrapped in multivesicular liposomes. *Am J Ophthalmol* 1987; 103: 714-6.
- Smith MF**, Sherwood MB, Doyle JW, Khaw PT. Results of intraoperative 5-fluorouracil supplementation on trabeculectomy for open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1992; 114: 737-41.
- Smith S**, D'Amore PA, Dreyer EB. Comparative toxicity of mitomycin C and 5-fluorouracil in vitro. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 332-7.
- Smith TJ**, Ashton P. Sustained-release subconjunctival 5-Fluorouracil. *Ophthalmic Surg Lasers* 1996; 23: 763-67.

- Stasi K**, Paccione J, Bianchi G, Friedman A, Danias J. Photodynamic treatment in a rabbit model of glaucoma surgery. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84: 661-6.
- Sugar HS**. Experimental trabeculectomy in glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1961; 51: 623-27.
- Takeuchi K**, Nakazawa M, Yamazaki H, Miyagawa Y, Ito T, Ishikawa F, Metoki T. Solid hyaluronic acid film and the prevention of postoperative fibrous scar formation in experimental animal eyes. *Arch Ophthalmol* 2009; 127: 460-4.
- Tamm S**, Tamm E, Rohen JW. Age-related changes of the human ciliary muscle. A quantitative morphometric study. *Mech Ageing Dev* 1992; 62: 209-21.
- Thorpe RM**, Kolker AE. A tonographic study of water loading in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1967; 77: 238-43.
- Tielsch JM**, Katz J, Singh K, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, Sommer A. A population-based evaluation of glaucoma screening: the Baltimore Eye Survey. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 1102-10.
- Tripathi RC**, Li J, Chan WF, Tripathi BJ. Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF-beta 2. *Exp Eye Res* 1994; 59: 723-7.
- Tripathi RC**, Li J, Tripathi BJ, Chalam KV, Adamis AP. Increased level of vascular endothelial growth factor in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmology* 1998; 105: 232-7.
- Trope GE**, Cheng YL, Sheardown H, Liu GS, Menon IA, Heathcote JG, Rootman DS, Chiu WJ, Gould L. Depot drug delivery system for 5-fluorouracil after filtration surgery in the rabbit. *Can J Ophthalmol* 1994; 29:263-26.
- Tsurumaru N**, Arai M, Teruya K, Sueda J, Yamakawa R. Seprafilm as a new antifibrotic agent following trabeculectomy in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol* 2009; 53: 164-70.
- Van Bergen T**, Vandewalle E, Van de Veire S, Dewerchin M, Stassen JM, Moons L, Stalmens I. The role of different VEGF isoforms in scar formation after glaucoma filtration surgery. *Exp Eye Res* 2011; 93: 689-99.
- Van Buskirk EM**. Changes in the facility of aqueous outflow induced by lens depression and intraocular pressure in excised human eyes. *Am J Ophthalmol* 1976; 82: 736-40.
- Wang G**, Tucker IG, Roberts MS, Hirst LW. In vitro and in vivo evaluation in rabbits of a controlled release 5-fluorouracil subconjunctival implant based on poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Pharm Res* 1996; 13: 1059-64.

- Wong TT**, Mead AL, Khaw PT. Matrix metalloproteinase inhibition modulates postoperative scarring after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1097-103.
- Wong TT**, Mead AL, Khaw PT. Prolonged antiscarring effects of ilomastat and MMC after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 2018-22.
- Yan ZC**, Bai YJ, Tian Z, Hu HY, You XH, Lin JX, Liu SR, Zhuo YH, Luo RJ. Anti-proliferation effects of Sirolimus sustained delivery film in rabbit glaucoma filtration surgery. *Mol Vis* 2011; 17: 2495-506.
- Yeo Y**, Baek N, Park K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2001; 6: 213-30.
- Yeo Y**, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 1-12.
- Yu DY**, Morgan WH, Sun X, Su EN, Cringle SJ, Yu PK, House P, Guo W, Yu X. The critical role of the conjunctiva in glaucoma filtration surgery. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28: 303-28.
- Zidan AS**, Sammour OA, Hammad MA, Megrab NA, Hussain MD, Khan MA, Habib MJ. Formulation of anastrozole microparticles as biodegradable anticancer drug carriers. *AAPS Pharm Sci Tech* 2006; 7 (3) Article 61: E1-E9.
- Zignani M**, Einmahl S, Baeyens V, Varesio E, Veuthey JL, Anderson J, Heller J, Tabatabay C, Gurny R. A poly (ortho ester) designed for combined ocular delivery of dexamethasone sodium phosphate and 5-fluorouracil: subconjunctival tolerance and in vitro release. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 251-5.

Anexo

The PLGA implant as a drug delivery system for antimitotics after experimental trabeculectomy

Rodríguez-Agirretxe I, et al.

PURPOSE. To investigate the effect of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) implants loaded with mitomycin C (MMC) and with different adjuvant treatments after glaucoma filtration surgery (GFS), in comparison to standard treatments.

METHODS. Forty-two New Zealand White rabbits underwent bilateral GFS and received different treatments (left eye): topical MMC (group 1); topical 5-fluorouracil (5-FU) (group 2); PLGA implant (group 3); MMC-loaded and -coated PLGA implant (group 4); MMC-loaded and 5-FU-coated PLGA implant (group 5); subconjunctival bevacizumab (group 6); MMC loaded PLGA implant and subconjunctival bevacizumab (group 7) and no treatment (right eye of all animals) (group 8). Intraocular pressure (IOP) and filtering bleb were evaluated at 0, 1, 5, 7, 14, 21 and 28 days after GFS. Histology was performed to examine the conjunctiva, sclerotomy, filtering bleb and persistence of the implant.

RESULTS. The best hypotensive results were achieved in the MMC-loaded and -coated PLGA implant group (group 4), which presented the lowest IOP values on days 1, 5, 7, 14 and 28 after GFS. Excluding the implant groups, bleb survival was superior to controls in groups 1, 2 and lower in group 6. Group 7 presented greater extension, height and vascularization of the bleb. Epithelial thinning and lymphoplasmacytic infiltrate were observed in groups 1, 2, 4, 5 and 7.

The rates of closure of the sclerotomy and bleb were 100% and 76% respectively and implant persistence was 95%.

CONCLUSIONS. MMC-loaded and -coated implants have optimal surgical results, followed by topical MMC application. In this experimental model, bevacizumab may be antagonistic to MMC.

Glaucoma filtration surgery (GFS) is currently one of the most effective methods for treating glaucoma. Unfortunately, this surgery tends to fail over time due to the excessive scarring at the filtering bleb¹. Numerous strategies have been employed to modulate wound healing and increase surgical success [beta radiation², 5-fluorouracil (5-FU)³, mitomycin C (MMC)⁴, growth factor inhibitors^{5,6}, etc.]. However, these drugs may be relatively ineffective or give rise to an increase in complications, such as persistent postoperative hypotony, corneal problems, filtering bleb leakage, endophthalmitis, etc. The development of drug delivery systems to release antimitotics, would facilitate the administration of these agents at appropriate doses and for the required time, leading to better surgical outcomes.

Poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA is a biodegradable polyester which is currently used in the manufacture of implants, microparticles and nanoparticles. It can be easily produced and has

predictable decomposition kinetics. It is degraded by the hydrolysis of its corresponding monomers (lactic and glycolic acids), which are eliminated with minimal systemic toxicity. PLGA has been used previously as a drug delivery system for 5-FU^{7,8} and sirolimus⁹ in experimental GFS in rabbit, with satisfactory short-term results.

Thus, the purpose of this study was to investigate the clinical and histological outcomes of an MMC-loaded PLGA implant with different adjuvant treatments after experimental trabeculectomy in the rabbit eye.

MATERIALS AND METHODS

Animals and anesthesia

All animal experiments were conducted according to the guidelines of the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research and approved by the Ethics Committee of the Basque Country University. Forty-two New Zealand White female rabbits (weight, 2.5–2.7 kg) were used in the study. Rabbits were anesthetized using a combination of ketamine (40 mg/kg; ketolar 50 mg/ml, Pfizer, Madrid, Spain) and xylazine (8 mg/kg; Rompun 20 mg/ml, Bayer, Barcelona, Spain), administered by intramuscular injection before surgery.

Glaucoma filtration surgery

GFS was performed by the same surgeon, in both eyes of each animal, considering the right eye as control. Briefly, after placing a partial-thickness corneal traction suture, a fornix-based conjunctival

flap was performed on the superior lateral quadrant of the eye. A half-thickness, rectangular, 4×3 mm scleral flap was then dissected, and a clear corneal paracentesis was carried out. Then, a 2×1.5 mm sclerectomy followed by peripheral iridectomy were performed. The scleral flap was closed with two 10-0 nylon sutures (Alcon Surgical, Forth-Worth, TX, USA). Finally, one drop of both atropine 1% eye drops (Colircusi Atropina, Alcon-Cusí, El Masnou, Barcelona, Spain) and the combination of tobramycin and dexamethasone (Tobradex colirio, Alcon-Cusí, El Masnou, Barcelona, Spain) were instilled.

Rabbits were randomly allocated to 7 groups (n=6 per group), in relation to the adjuvant treatment administered to the left eye, described as follows. Group 1: topical intraoperative MMC (surgical sponge soaked in 0.4 mg/ml solution, applied for 5 minutes); group 2: topical intraoperative 5-FU (surgical sponge soaked in 50 mg/ml solution, applied for 5 minutes); group 3: PLGA drug-free implant without adjuvant treatment; group 4: MMC-coated PLGA implant containing MMC microparticles; group 5: 5-FU-coated PLGA implant containing MMC microparticles; group 6: postoperative subconjunctival bevacizumab (0.05 ml; Avastin, Roche Farma, Madrid, Spain); group 7: non-coated PLGA implant containing MMC microparticles and subconjunctival bevacizumab; group 8: the right eye of each animal treated with trabeculectomy without adjunctive treatment (i.e. all animals in groups 1-7; n=42).

Topical MMC and 5-FU were applied prior to dissection of the

scleral flap, over the filtration site and irrigated thoroughly with 20 ml of balanced salt solution. Implants were placed subconjunctivally, adjacent to the surgical site, just before conjunctival closure. The concentration of MMC employed in the manufacture of the implants, as well as on their coating, was 1.25 mg/ml. The concentration of 5-FU employed as coating was 66.25 mg/ml. Bevacizumab was administered in a single subconjunctival injection at the bleb site, once surgery had concluded. The PLGA implant was prepared by accumulation of microspheres obtained through the solvent evaporation / extraction method.

Clinical examination

Evaluations were performed preoperatively and postoperatively at 0, 1, 5, 7, 14, 21 and 28 days after trabeculectomy. These examinations included measurement of intraocular pressure (IOP) and analysis of the bleb.

IOP was determined by rebound tonometry (Icare VET, Icare Finland, Helsinki, Finland) after instillation of a mixture of oxybuprocain and tetracain (Colircusí anestésico doble, Alcon-Cusí, El Masnou, Barcelona, Spain). Two sets of six measurements of IOP were performed, yielding an average value for both series. All determinations were performed by the same observer and at the same time of the day (10 to 12 am).

The characteristics of the filtering bleb were analyzed according to Moorfields bleb grading system¹⁰. This classification scores the bleb with respect to a set of reference

photographs, taking into account bleb height, extension and vascularity.

Histological analysis

On day 30, animals were killed by means of anesthetic overdose. After the enucleation of both eyes, specimens were fixed in 4% formaldehyde, cryopreserved in 30% sucrose and included in OCT. Then, they were cut into 14 μ m sections on a cryostat and stained with hematoxylin-eosin and Verhoeff (Verhoeff's hematoxylin). Sections were cut taking as a reference the suture points of the trabeculectomy, in such a way that the sections included the intervened area and the control area (opposite limbal region). These preparations were examined and photographed using a microscope, with particular attention to the characteristics of the conjunctival epithelium, stromal cell infiltration and persistence of the sclerotomy, filtering bleb and implant.

Statistical analysis

Statistics were performed using SPSS software (SPSS Sciences, Chicago, Illinois, USA). Normality of variables was analyzed with the Kolmogorov-Smirnov test. IOP values were analyzed using parametric tests (Student t test, ANOVA of repeated measurements and the Tukey contrast test). The bleb was analyzed using non-parametric tests (Mann-Whitney U test, Wilcoxon W test and the Kruskal-Wallis H test). The correlation between IOP and the filtering bleb variables was evaluated using the Spearman correlation test. We also analyzed GFS survival using the Kaplan-

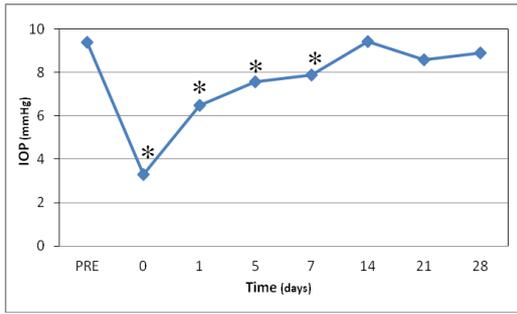


Figure 1. Evolution of mean IOP (mmHg) over time, in the control group. * Statistically significant differences with respect to basal IOP.

Time	Mean	SD
Pre	9.39	1.61
0	3.29	4.07
1	6.49	2.73
5	7.56	1.32
7	7.88	1.93
14	9.44	2.05
21	8.59	2.11
28	8.86	1.49

Table 1. IOP values (mmHg) in the control group. SD, standard deviation

Meier method, defining surgical failure as the return to the basal IOP ± 1 mmHg or the disappearance of the filtering bleb (grade 1 extension bleb). The level of statistical significance was considered to be $P < 0.05$.

RESULTS

Intraocular pressure

Control group

The control group exhibited IOP reduction with respect to pre-operative values, at all stages of the study, with the exception of day 14. This reduction was statistically significant at 0, 1, 5 and 7 days after GFS ($P < 0.01$) (Fig. 1, Table 1). Mean surgical survival in this group, as a function of IOP, was 11.9 days (Fig. 3, Table 2).

Study groups

Group 1 (topical MMC) showed improved results with respect to the control group throughout the study period (Fig. 2) and particularly at 14 ($P=0.006$) and 21 days ($P=0.005$) after surgery. Paradoxically, IOP was higher than control immediately after surgery ($P=0.016$). Mean surgical survival for this group was 21.6 days (Fig. 3, Table 2).

In group 2 (topical 5-FU), IOP was found to decrease in a similar manner (Fig. 2), although this decrease was significantly different with respect to the control group at 7 ($P=0.03$) and 14 days ($P=0.049$) post operation. The only difference with group 1 was found at day 1, in which IOP with 5-FU was also higher than control. Mean surgical

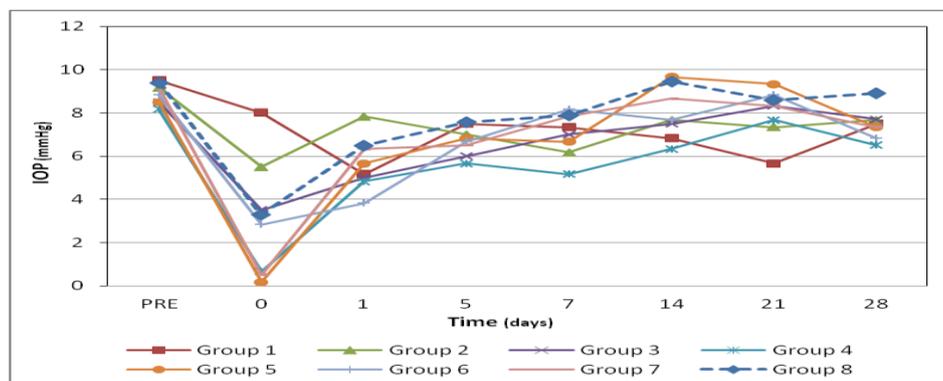
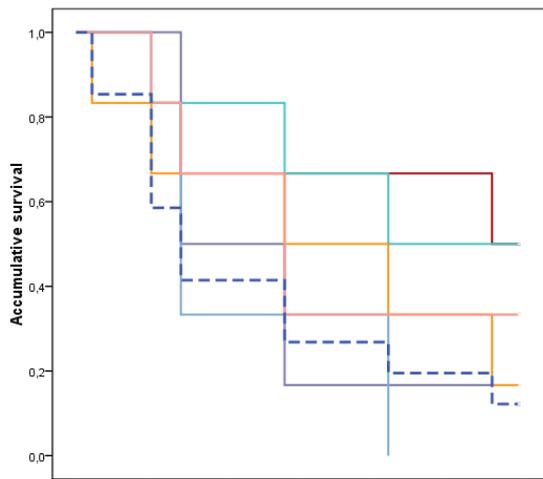


Figure 2. Evolution of mean IOP (mmHg) over time, in all the study groups.



Group
 1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8

Group	Mean survival
1	21.6
2	16.6
3	13.1
4	22
5	16.5
6	11.3
7	16.6
8	11.9

Table 2. Mean survival of the GFS (days) as a function of IOP in each group.

Figure 3. Analysis of surgical survival as a function of IOP by means of the Kaplan-Meier method.

survival for this group was 16.6 days, which was longer than that for the control group, but shorter than that of the topical MMC group (Fig. 3, Table 2).

In group 3 (empty PLGA implant), IOP was reduced at 1, 5, 7 and 14 days post surgery, with respect to the control group (Fig. 2), with this reduction being statistically significant at 5 ($P=0.012$) and 14 ($P=0.029$) days. Surgical survival in this group was similar to that of the control group (13.1 days; Fig. 3, Table 2). These results are demonstrative of an isolated hypotensive effect due to the spacing effect of the implant.

Group 4 (MMC-loaded and -coated PLGA implant) presented IOP reduction at all stages of the study (Fig. 2), and significantly at 5 ($P=0.002$), 7 ($P=0.004$), 14 ($P=0.001$) and 28 days ($P=0.001$).

The longest survival results are associated with this group (22 days) (Fig. 3, Table 2).

Group 5 exhibited values inferior to those of the control group throughout the study (Fig. 2); these differences were statistically significant at 28 days post surgery ($P=0.027$).

Mean surgical survival for this group

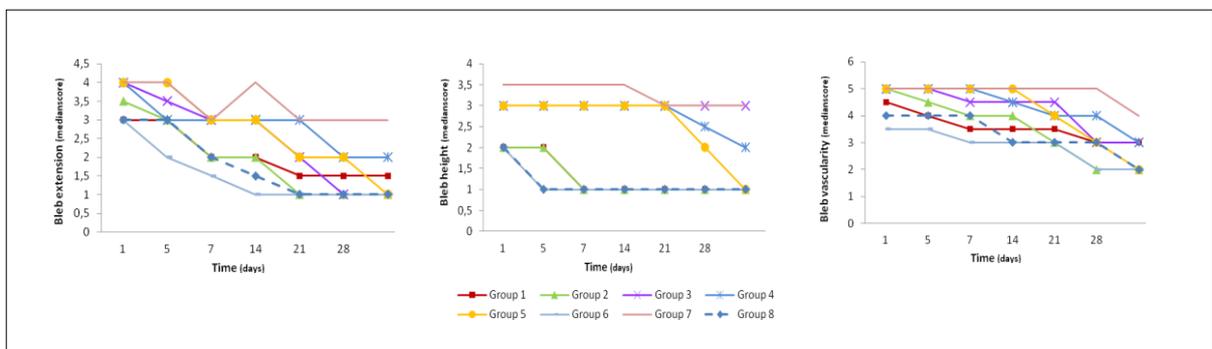


Figure 4. Evolution of median bleb grading as function of extension (A), height (B) and vascularity (C). Note the bias induced of the spacing effect of the implant on bleb extension and height in groups 3, 4, 5 and 7.

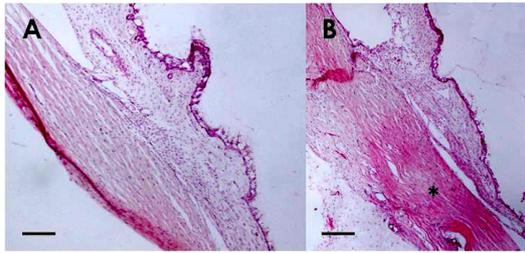


Figure 5. Anatomical view of the iridocorneal angle in control (A) and experimental (B) zones. An increase in scleral density can be observed (*). Hematoxylin-eosin staining. Bar, 200 μ m.

was 16.5 days, which is longer than that of the control group (Fig. 3, Table 2)

Group 6 animals (subconjunctival bevacizumab) experienced IOP reduction after 1, 5, 14 and 28 days of GFS (Fig. 3), with this reduction being statistically significant at 1 ($P=0.03$), 14 ($P=0.049$) and 28 days ($P=0.004$).

Despite this, mean GFS survival for this group was shorter than that of the control group (11.3 days vs. 11.9 days) (Fig. 2, Table 2).

In group 7, we observed IOP reduction throughout the study (Fig. 2), which was statistically significant

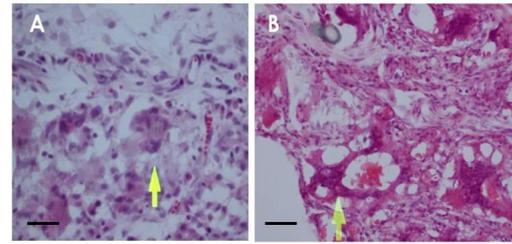


Figure 7. Presence of multinucleated gigantic cells (arrows) during the degradation phase of the implant, one month post surgery. Hematoxylin-eosin staining. Bar, 50 μ m (A,B).

only after 28 days ($P=0.032$), as was observed in group 5. Mean survival for this group was 16.6 days (Fig. 3, Table 2).

Upon comparing the different coadjuvant treatments, we found statistically significant differences between groups. The groups which contributed to these differences were group 4 and group 8 (control).

The best results were obtained in group 4, which presented the lowest values of IOP at days 1, 5, 7, 14 and 28. These results were exceeded only by group 2 at day 21 and by group 5 immediately post surgery.

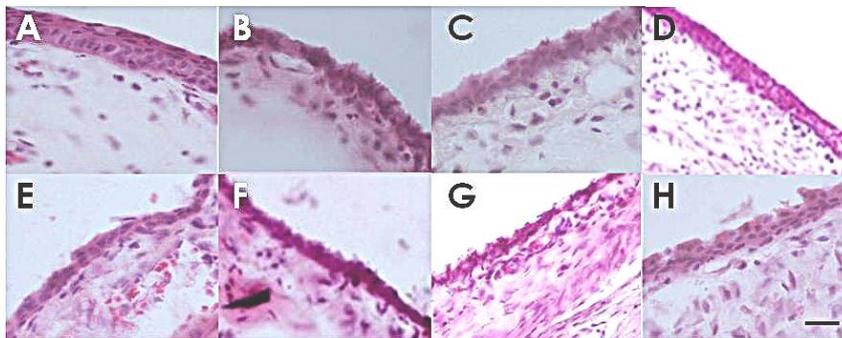


Figure 6. View of the conjunctival epithelium and stroma in the filtering bleb. Epithelium in the control group (A). Thinned epithelium in groups 1 and 2, which involve topical antimetabolites (B,C). Normal-thickness epithelium in empty implant (group 3, D). Thinned epithelium with underlying infiltration in groups 4, 5 and 7 (E,F,H). Thinned epithelium, with infiltration and subepithelial fibrosis in the bevacizumab group 6 (G). Hematoxylin-eosin staining. Bar, 50 μ m.

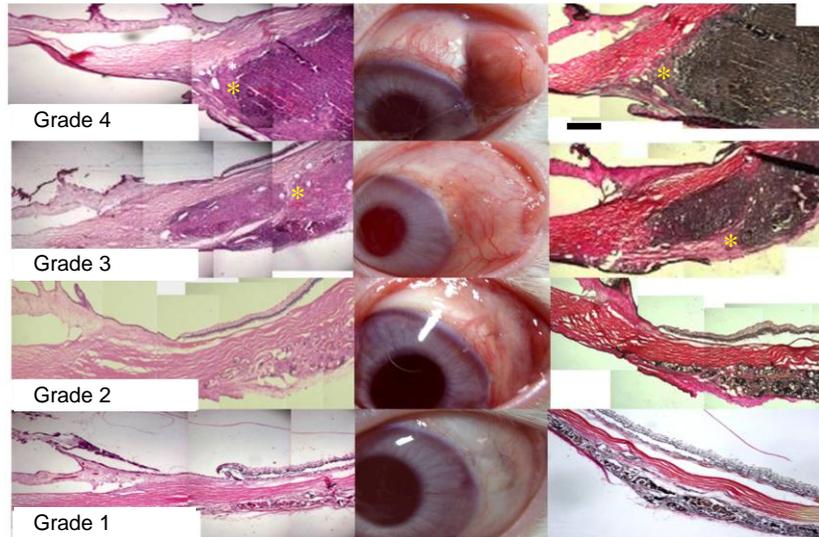


Figure 8. Degree of persistence of the implant, 30 days after surgery, and different bleb gradings. A fibrous capsule can be observed (*). Hematoxylin-eosin and Verhoeff's staining. Bar, 50 μ m.

Bleb grading

Control group

In this group, we observed a progressive disappearance of the filtering bleb (Fig. 4), with an associated mean survival of 12.9 days. In statistical terms, the bleb was patent in its extension on days 1, 5 and 7 ($P < 0.001$) and in its height on days 1 ($P < 0.001$) and 5 ($P = 0.005$). More intense vascularization of the bleb was seen on days 1, 5, 7, 14 ($P < 0.001$) and 21 ($P = 0.02$).

Study groups

Similarly, we observed a decreasing pattern in bleb grade in all study groups (Fig. 4). Mean surgical survival, as function of bleb extension, was longer than that of the control group in groups 1 (22 days) and 2 (14.1 days), and shorter in group 6 (11.1 days). In the other groups, survival could not be determined due to the bias induced by the spacing effect of the implant. Filtering bleb vascularization presented a decreasing pattern in all

groups, which was not statistically different to that of the controls, with the exception of the implant groups, with higher hyperemia ($P < 0.05$ in all cases, from day 1) and of group 6, which was less hyperemic on day 1 ($P = 0.003$) (Fig. 4).

Group comparison revealed a larger bleb size in the groups with implant. Of these, group 7 presented larger values of height, extension and vascularization of the bleb conjunctiva.

Analysis of correlation revealed a negative correlation between IOP and the area and height of the filtering bleb. In the case of area, this correlation was significant at day 28 ($r_s = -0.259$; $P = 0.03$). In the case of height, significance was found on days 5 ($r_s = -0.262$; $P = 0.017$), 14 ($r_s = -0.28$; $P = 0.032$) and 28 ($r_s = -0.329$; $P = 0.005$).

Similar GFS survival periods were found, independent of the criterion of surgical survival which was employed (IOP or bleb grade). Thus,

once we had excluded the implant groups, due to the bias introduced in

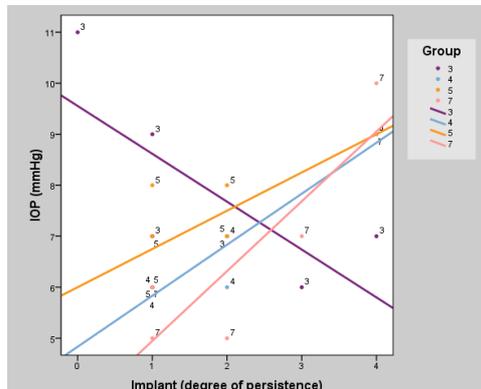


Figure 9. Scatter plot showing the relation between IOP and degree of persistence of the implant in each group.

bleb grading, we found better results in group 1, followed by groups 2, 8 and 6 respectively.

Anatomopathology

Histological analysis of the eye globes revealed closure of the surgical fistula in all cases. Upon comparing the sclera of the operated zone with that of the control zone, an increase in the density of scleral collagen could be seen in the operated zone (Fig. 5).

We observed epithelial thinning in groups 1, 2, 4, 5 and 7, accompanied by lymphoplasmacytic stromal infiltration. In contrast, no signs of this thinning were apparent in group 3, despite presenting the same type of stromal infiltration. Group 6 showed clear epithelial alterations, lymphoplasmacytic infiltration and stromal fibrosis (Fig. 6). In implant-containing animals, the infiltrate consisted principally of lymphoplasmacytic cells, occasionally macrophages, polymorphonuclear cells and multinucleated gigantic cells (Fig. 7).

In the majority of animals (76% of cases), we did not find evidence of filtering bleb at the time of necropsy.

We verified implant persistence in 95% of eyes. However, despite the different degree of persistence of the implant (Fig. 8), there was no evidence of statistical differences among groups in this regard. In group 3, we found a negative correlation between IOP and implant persistence ($r_s = -0.956$; $P = 0.003$). In contrast, in Groups 4, 5 and 7 (pharmacologically loaded implants), we found a positive IOP-implant persistence correlation ($r_s = 0.67$, 0.53 and 0.73 respectively; $P > 0.05$) (Fig. 9). Finally, it should be noted that some of the implants were found to be encapsulated, principally those of group 7 (85% of cases) (Fig. 8).

DISCUSSION

An ideal drug delivery system is biocompatible and biodegradable, and should facilitate the local release of drug without local or systemic toxicity. To date, diverse materials have been studied as drug delivery systems for antimetabolites in experimental filtration surgery. Polyanhydrides are biodegradable polymers, which have been studied as a vehicle for the release of 5-FU¹¹ and MMC¹². One of their inconveniences is their association with dehiscence processes of the wound and implant extrusion¹³. Vinyls have also been used as 5-FU vehicles in primates¹⁴. Despite the fact that they are not biodegradable, they do not need to be removed, since they are inert materials. Collagen has also been used as a drug delivery system for antimetabolites in animals¹⁵ and humans¹⁶.

However, despite its biodegradable nature, it has been associated with local inflammatory phenomena.

Polyorthoesters are biodegradable polymers which have prolonged GFS survival in rabbit, by means of 5-FU release¹⁶. Their principal limitation consists in the relatively long time required to produce them and their unreliable release kinetics. In contrast, polyhydroxyesters [polylactic acid (PLA); poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and polycaprolactone (PLC)] are biodegradable polymers which have been used in implant, microparticle and nanoparticle treatments. PLA has been used in experimental models of GFS in the rabbit as a drug delivery system for 5-FU. Despite its good results, it has the inconvenience of persistence and long-term encapsulation¹⁷. In contrast, PLGA has a shorter degradation half-life than PLA and it has been found to have minimal toxicity in the rabbit as a drug delivery system for 5-FU^{7,19,20}.

In the present study, we have used the albino rabbit, since it is the most typically used animal in experimental studies of GFS. In addition, this animal is easy to manage and house and is inexpensive. Given its efficient wound healing characteristics, it allows a shortening of follow-up times and would be equivalent to a model of high risk surgical failure, with accompanying antimitotic treatment²¹.

The standard in wound healing studies after GFS consists in the intervention of a healthy eye, without prior induction of glaucoma. In this way, the iatrogenic effects which could produce the induction of glaucoma are avoided. However, by

intervening normotensive eyes, IOP measurement as a parameter during follow-up is no longer available²². In fact, in models similar to ours, some authors reject IOP as a criterion of surgical functionality, considering only filtering bleb^{17,23,25,26}, while others claim that the IOP would be higher than the bleb measurement^{19,26}. In the present study, we found that both parameters are efficacious, presenting, as expected, an inverse correlation. It should be recognized however that in measuring bleb size, we excluded rabbits with implants, since the anatomical effect of the implant was indistinguishable from that of the filtering bleb.

The surgical technique employed herein has been used previously and it is very similar to what we routinely use in daily clinical practice^{12,17}. Some other authors tend to use other techniques such as posterior-lip sclerotomy^{11,27} or perform sclerotomy with the placing of a cannula draining into the subconjunctival space^{23,28,29}. Upon comparing the different techniques, Esson concluded that sclerotomy with cannula induces lower synthesis of wound-healing mediators than posterior-lip sclerotomy³⁰. This study demonstrates that the GFS experimental model described herein can efficaciously reduce IOP, and facilitate the formation of the filtering bleb, with similar surgical survival rates, independent of the failure criterion employed.

The doses and administration routes of 5-FU, MMC and bevacizumab have been adopted from other studies^{6,23,31,32,33}. In the case of bevacizumab, we choose to study its administration in a single dose⁶,

in order to be able to compare its effects with those of other treatments. Other authors have recommended its repeated administration, due to its short half life²⁵.

All of the evaluated treatments exhibit a hypotensive effect which was superior to that found in the control group. Excluding the implant-containing groups, bleb formation was also higher in the experimental groups than in the control group. The bevacizumab group is the only exception, since surgical survival in this group was shorter than that of the control group, independently of the failure criterion employed.

Topical MMC was surpassed in reducing IOP only by implants which were loaded and covered with MMC. We found no evidence of corneal complications (opacity and neovascularization), hypotony or endophthalmitis in contrast to that reported by other authors^{19,32}. The histological alterations observed in the conjunctiva are very similar to those reported by Sherwood, despite the difference in the time of analysis (2 weeks vs. 1 month in our study)²⁸.

Topical 5-FU achieved a hypotensive effect which was lower than that of MMC administered topically or via implant, but higher than that associated with the isolated implant and bevacizumab. These results corroborate those of other authors in terms of hypotensive effect^{17,18}, but differ in terms of bleb formation. Thus, Einmahl reported an 83% persistence of bleb one month after injection of polyorthoesters loaded with 5-FU¹⁷. As in the case of MMC, we did not find any complications

such as corneal edema^{17,18} or avascular filtering bleb³².

Subconjunctival bevacizumab treatment achieved reduced IOP in comparison to controls. However, this reduction was somewhat irregular, and consequently, surgical survival was not improved. In addition, we found no improvement with bevacizumab in terms of filtering bleb formation. These findings contrast with those of other authors who have reported a longer life of the bleb, in the absence of IOP differences, when administered either alone³⁴ or repeatedly²⁵. As reported previously^{25,35}, the blebs of this group were found to be less hyperemic at the early postoperative stage. Histologically, we found more substantial conjunctival alterations than those reported by Memarzadeh, despite the fact that this author performed multiple postoperative injections²⁵.

The use of drug-free PLGA implants was also associated with reduced IOP, corroborating the spacing effect of the implant, as has been previously reported⁸. Our implants led to hyperemia throughout the study period, without associated complications arising, in line with the findings of Cui for PLA¹⁸. We did not observe implant encapsulation in any cases of this group, as might occur with other experimental groups. Other authors have already reported the presence of multinucleated gigantic cells^{7,14,17,27} which likely represent a foreign body response to the implants.

The mixed MMC application (encapsulated and covering the implant) was found to be the treatment with highest hypotensive efficacy. It is likely that the MMC

which covers the microspheres acts during the earlier stages, and is substituted by that liberated by the microspheres at a later stage. As detected in the other groups involving drug-loaded implants, we observed a correlation between IOP and the degree of persistence of the implant. This may be due to the encapsulation of the implant which in turn would lead to inhibition of MMC diffusion to tissue, resulting in increased IOP.

MMC implants coated with 5-FU exhibit improved IOP levels with respect to the control group. However, these improvements are not as large as those associated with the previous group and the topical MMC group. Lu obtained similar results upon comparing the effect of PLGA microparticles loaded with 5-FU and covered with MMC vs. topical MMC, despite the fact that the MMC dose in these studies was different¹⁹. The similarity between this group and the topical 5-FU group would indicate the absence of an additive effect between MMC and 5-FU in our study. Curiously, in this group, we observed a higher rate of implant degradation at the end of the study in comparison with the other implant-groups. This finding has been previously reported by others regarding PLGA⁷ and polyorthoesters¹⁷.

Finally, the group with MMC implant and bevacizumab exhibited reduced IOP, but to a lesser extent than that observed with the other implant-groups, indicating that there may be a certain antagonism between these drugs. In fact, Hilgert reported a higher degree of fibrosis upon combining both drugs, in comparison to using MMC alone³⁶. This antagonism can be seen

histologically as a higher degree of implant encapsulation in this group. In contrast, other authors have reported a synergistic effect of combining topical MMC and subconjunctival bevacizumab in humans³⁷.

In conclusion, in the present animal model, MMC-loaded and -coated PLGA implants provide optimal hypotensive results after GFS, indicating that this methodology may provide improved surgical outcomes in humans.

REFERENCES

1. Hitchings RA, Grierson I. Clinicopathological correlation in eyes with failed fistulizing surgery. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1983; 103: 84-8.
2. Kirwan JF, Rennie C, Evans JR. Beta radiation for glaucoma surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 2: CD003433.
3. Heuer DK, Parrish RK 2nd, Gressel MG, Hodapp E, Palmberg PF, Anderson DR. 5-fluorouracil and glaucoma filtering surgery. II. A pilot study. *Ophthalmology* 1984; 91: 384-94.
4. Chen CW, Huang HT, Bair JS, Lee CC. Trabeculectomy with simultaneous topical application of mitomycin-C in refractory glaucoma. *J Ocul Pharmacol* 1990; 6: 175-82.
5. CAT-152 0102 Trabeculectomy Study Group, Khaw P, Grehn F, Hollo G, Overton B, et al. A phase III study of subconjunctival human anti-transforming growth factor beta (2) monoclonal antibody (CAT-152) to prevent scarring after first-time trabeculectomy. *Ophthalmology* 2007; 114: 1822-30.
6. Grewal DS, Jain R, Kumar H, Grewal SP. Evaluation of subconjunctival bevacizumab as an adjunct to trabeculectomy a pilot study. *Ophthalmology* 2008; 115: 2141-45.
7. Gould L, Trope G, Cheng YL, Heathcote JG, Sheardown H, Rootman D, Liu GS, Menon IA. Fifty:fifty (DL glycolic acid-lactic acid) copolymer as a drug delivery system for 5-fluorouracil: a

- histopathological evaluation. *Can J Ophthalmol* 1994; 29: 168-171.
8. Trope GE, Cheng YL, Sheardown H, Liu GS, Menon IA, Heathcote JG, Rootman DS, Chiu WJ, Gould L. Depot drug delivery system for 5-fluorouracil after filtration surgery in the rabbit. *Can J Ophthalmol* 1994; 29:263-26.
 9. Yan ZC, Bai YJ, Tian Z, Hu HY, You XH, Lin JX, Liu SR, Zhuo YH, Luo RJ. Anti-proliferation effects of Sirolimus sustained delivery film in rabbit glaucoma filtration surgery. *Mol Vis* 2011; 17: 2495-506.
 10. Clarke JCK, Wells AP, Sangermani CD, Marks JR, Crowston JG, Peto T, Leung I, Khaw PT. A System for Grading Filtration Blebs Following Trabeculectomy. Presentation 1201. ARVO 2003. Ref Type: Abstract. www.blebs.net
 11. Lee DA, Leong KW, Panek WC, Eng CT, Glasgow BJ. The use of bioerodible polymers and 5-fluorouracil in glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29: 1692-97.
 12. Charles JB, Ganthier R Jr, Wilson MR, Lee DA, Baker RS, Leong KW, Glasgow BJ. Use of bioerodible polymers impregnated with mitomycin in glaucoma filtration surgery in rabbits. *Ophthalmology* 1991; 98: 503-8.
 13. Jampel HD, Leong KW, Dunkelburger GL, Quigley HA. Glaucoma filtration surgery in monkeys using 5-fluorouridine in polyanhydride disks. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 430-35.
 14. Blandford DL, Smith TJ, Brown JD, Pearson PA, Ashton P. Subconjunctival sustained release 5-fluorouracil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 3430-5.
 15. Hasty B, Heuer DK, Minckler DS. Primate trabeculectomies with 5-fluorouracil collagen implants. *Am J Ophthalmol* 1990; 109: 721-5.
 16. Herschler J. Long-term results of trabeculectomy with collagen sponge implant containing low-dose antimetabolite. *Ophthalmology* 1992; 99: 666-70.
 17. Einmahl S, Behar-Cohen F, D'Hermies F, Rudaz S, Tabatabay C, Renard G, Gurny R. A new poly (ortho ester)-based drug delivery system as an adjunct treatment in filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 695-700.
 18. Cui LJ, Sun NX, Li XH, Huang J, Yang JG. Subconjunctival sustained release 5-fluorouracil for glaucoma filtration surgery. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29: 1021-8.
 19. Lu DW, Chang CJ, Chiang CH, Yeh MK, Chou PI. Wound modulation after trabeculectomy by different formulations of antimetabolites in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000; 16: 529-38.
 20. Chiang CH, Tung SM, Lu DW, Yeh MK. In vitro and in vivo evaluation of an ocular delivery system of 5-fluorouracil microspheres. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001; 17: 545-53.
 21. Miller MH, Grierson I, Unger WI, Hitchings RA. Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. *Ophthalmic Surg* 1989; 20: 350-357.
 22. McGuigan LJ, Mason RP, Sanchez R, Quigley HA. D-penicillamine and beta-aminopropionitrile effects on experimental filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987; 28:1625-9.
 23. Cordeiro MF, Constable PH, Alexander RA, Bhattacharya SS, Khaw PT. Effect of varying the mitomycin-C treatment area in glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1639-46.
 24. Mead AL, Wong TT, Cordeiro MF, Anderson IK, Khaw PT. Evaluation of anti-TGF-beta2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 3394-401.
 25. Memarzadeh F, Varma R, Lin LT, Parikh JG, Dustin L, Alcaraz A, Elliott D. Postoperative use of bevacizumab as an antifibrotic agent in glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 3233-7.
 26. Grisanti S, Szurman P, Warga M, Kaczmarek R, Ziemssen F, Tatar O, Bartz-Schmidt KU. Decorin modulates wound healing in experimental glaucoma filtration surgery: a pilot study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 191-6.
 27. Kimura H, Ogura Y, Moritera T, Honda Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Injectable microspheres with controlled drug release for glaucoma filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 3436-41.
 28. Sherwood MB. A sequential, multiple-treatment, targeted approach to reduce wound healing and failure of glaucoma filtration surgery in a rabbit model (an American Ophthalmological Society

- thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; 104: 478-92.
29. Wong TT, Mead AL, Khaw PT. Matrix metalloproteinase inhibition modulates postoperative scarring after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1097-103.
30. Esson DW, Neelakantan A, Iyer SA, Blalock TD, Balasubramanian L, Grotendorst GR, Schultz GS, Sherwood M. Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 485-91.
31. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Grierson I, Schultz G, McGorray S. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 263-7.
32. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Smith MF, McGorray S. Effects of intraoperative 5-fluorouracil or mitomycin C on glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Ophthalmology* 1993; 100: 367-72.
33. Oh SY, Youn, DH, Kim DM, Hong Ch. The effects of intraoperative mitomycin-C or 5-fluorouracil on glaucoma filtering surgery. *Korean J Ophthalmol* 1994; 8: 6-13.
34. Li Z, Van Bergen T, Van de Veire S, Van de Vel I, Moreau H, Dewerchin M, Maudgal PC, Zeyen T, Spileers W, Moons L, Stalmans I. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 5217-25.
35. How A, Leng Leng Chua J, Charlton A, Su R, Lim M, Kumar RS, Crowston JG, Wong TT. Combined treatment with bevacizumab and 5-fluorouracil attenuates the postoperative scarring response after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 928-32.
36. Hilgert CR, Hilgert AH, Odashiro PR, Odashiro AN, Paranhos A. Lack of bevacizumab antiangiogenic effect when used combined with mitomycin C in glaucoma filtration surgery in the rabbit: histopathological and immunohistochemical analyses. *IOVS* 2011; 52: ARVO E-abstract 634.
37. Choi JY, Choi J, Kim YD. Subconjunctival bevacizumab as an adjunct to trabeculectomy in eyes with refractory glaucoma: a case series. *Korean J Ophthalmol* 2010; 24: 47-52.

