



Universidad de Granada
Facultad de Medicina

**EFFECTOS CITOTÓXICOS DE LOS COLIRIOS
ANÁLOGOS DE PROSTAGLANDINAS
SOBRE LAS CÉLULAS CONJUNTIVALES
HUMANAS EN CULTIVO**

TESIS DOCTORAL
FERNANDO PÉREZ ROCA
Licenciado en Medicina y Cirugía
Magíster en Ingeniería Tisular
2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Fernando Pérez Roca

ISBN: 978-84-9125-903-9

URI: <http://hdl.handle.net/10481/43880>

EFFECTOS CITOTÓXICOS DE LOS COLIRIOS ANÁLOGOS DE PROSTAGLANDINAS SOBRE LAS CÉLULAS CONJUNTIVALES HUMANAS EN CULTIVO

**Memoria que presenta el licenciado en Medicina y Cirugía
y magíster en Ingeniería Tisular
Fernando Pérez Roca
para aspirar al título de Doctor**

Fdo. Fernando Pérez Roca

VºBº Directora de Tesis

**Fdo. Dra. Ingrid Johanna Garzón Bello
Doctora en Ingeniería Tisular
Universidad de Granada**

VºBº Director de Tesis

VºBº Director de Tesis

**Fdo. Dr. Miguel Alaminos Mingorance
Doctor en Medicina y Cirugía
Doctor en Ciencias Biológicas
Universidad de Granada**

**Fdo. Dr. Antonio Campos Muñoz
Doctor en Medicina y Cirugía
Universidad de Granada**

**Departamento de Histología
Universidad de Granada**

2016

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por los Proyectos de Investigación “Elaboración de un modelo biomimético de córnea artificial humana nanoestructurada a partir de células madre corneales y mesenquimales (PI 11/1582)” y “Generación de córneas artificiales con epitelio y endotelio transdiferenciados y biomateriales nanoestructurados de curvatura controlada (PI 14/0955)” del fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III.

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en el siguiente artículo científico original:

Effects of Four Formulations of Prostaglandin Analogs on Eye Surface Cells. A Comparative Study. Pérez-Roca F, Rodrigo-Morales E, Garzón I, Oliveira AC, Martín-Piedra MÁ, Carriel V, Ortiz-Pérez AI, Sánchez-Montesinos I, Campos A, Alaminos M. PLoS One. 2015 Jun 12;10(6):e0129419. doi: 10.1371/journal.pone.0129419. eCollection 2015. Factor de Impacto: 3.534; Percentil: 15

COMPROMISO DE RESPETO DE DERECHOS DE AUTOR

El doctorando **Fernando Pérez Roca** y los tutores de la Tesis Doctoral D^a **Ingrid Johanna Garzón Bello**, D. **Miguel Alaminos Mingorance** y D. **Antonio Campos Muñoz** garantizamos, al firmar este Tesis, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores al ser citados, cuando se han utilizados sus resultados o publicaciones.

Granada, a 4 de Febrero de 2016.

Los directores de tesis

El doctorando

Fdo Ingrid Johanna Garzón Bello

Fdo Fernando Pérez Roca

Fdo Miguel Alaminos Mingorance

Fdo Antonio Campos Muñoz

AGRADECIMIENTOS

Ahora que por fin veo este trabajo concluido, quiero agradecer a todos aquellos que han contribuido a su realización.

En primer lugar, a mis tutores, los doctores Ingrid Garzón, Miguel Alaminos y Antonio Campos, por haber sido la piedra angular de este proyecto; sin vuestra sabiduría y dirección habría sido imposible llevar a cabo este trabajo. Creo que formáis y dirigís un equipo maravilloso, sois trabajadores incansables, generosos en el esfuerzo y humildes en el éxito.

A mi padres: a mi madre, María Angustias, por su educación y apoyo incondicional, por haberme enseñado a poner todo el cariño en mi trabajo; a mi padre el Dr. Antonio Jesús Pérez de la Cruz, que siempre me animó a realizar esta Tesis Doctoral y al cual admiro profundamente. Para mí, es el modelo a seguir en la vida y en lo profesional; ser su hijo es un privilegio y una hermosa responsabilidad. Gracias por vuestro apoyo decidido.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a mi amiga y compañera Esther Rodrigo, con la que he compartido incontables horas de experimentos y sin la que no habría podido finalizar este proyecto; a Ana Celeste, por enseñarme y ayudarme con las técnicas de laboratorio, y por supuesto a Miguel Ángel y Sebastián por su colaboración con las células y los ensayos.

Al Dr. Vicente Crespo, por su apoyo y tutoría en el Master de Ingeniería Tisular que cursé en el Departamento de Histología previamente a esta Tesis.

Al Dr. Juan Ramos, por su ánimo y consejos en los momentos iniciales. Además quiero hacer este agradecimiento extensible al personal del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, donde cursé la residencia y se tomaron las biopsias operatorias de células conjuntivales.

También me gustaría reconocer a la *Biblioteca Virtual del Sistema Sanitario Público de Andalucía*, por acercarme a las fuentes de la información y darme acceso a las revistas científicas.

Por supuesto, a mi familia, por ser el soporte de mi vida; y a mi mujer Ana, que siempre me ha acompañado en este proyecto con ilusión.

A todos gracias.

¡Sapere aude!

“¡Atrévete a pensar”, “atrévete a saber!”

Immanuel Kant.
Qué es la Ilustración.

ÍNDICE

I) Introducción.....	4
1. Anatomía e histología	
1.1 Embriología ocular.....	6
1.2 Anatomía del ojo.....	8
2. Glaucoma	
2.1 Concepto.....	22
2.2 Presión intraocular.....	23
2.3 Clasificación.....	25
2.4 Factores de riesgo.....	28
2.5 Tratamiento.....	29
3. Farmacología	
3.1 Farmacocinética ocular.....	31
3.2 Farmacología antiglaucomatosa.....	34
3.2.1 Betabloqueantes.....	36
3.2.2 Agonistas adrenérgicos.....	36
3.2.3 Inhibidores de la anhidrasa carbónica.....	37
3.3.4 Análogos de las prostaglandinas.....	37
3.3 Conservantes en los colirios oftálmicos.....	38
3.3.1 Cloruro de benzalconio.....	40
4. Viabilidad celular	
4.1. Ensayos funcionales.....	44
4.2 Evaluación integridad de membrana.....	46
4.3 Otros ensayos.....	46
II) Objetivos.....	47
1. Objetivo principal.....	48
2. Objetivos específicos.....	48

III) Materiales y métodos.....	49
1. Obtención de biopsias conjuntivales.....	50
2. Aislamiento de células estromales conjuntivales.....	50
3. Subcultivos celulares.....	51
4. Grupos de estudio.....	51
5. Evaluación de viabilidad celular mediante WST-1.....	53
6. Evaluación de viabilidad celular mediante MTT.....	54
7. Evaluación de viabilidad celular mediante LIVE/DEAD.....	55
8. Análisis estadístico.....	56
V) Resultados.....	58
VI) Discusión.....	72
VII) Conclusiones.....	84
VII) Bibliografía.....	87

ABREVIATURAS

BAK: Cloruro de benzalconio (*benzalkonium chloride*).

c/d: Relación copa/disco.

DL50: Dosis letal 50.

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético.

FDA: *Food and Drugs Administration*.

GPAA: Glaucoma primario de ángulo abierto.

GPAC Glaucoma primario de ángulo cerrado.

GSAA: Glaucoma secundario de ángulo abierto.

GSCA Glaucoma secundario de ángulo cerrado.

MTT: Técnica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio.

PBS: Tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*).

PIO: Presión intraocular.

WST-1: Técnica del sodio 5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio.

INTRODUCCIÓN

La introducción de la presente Tesis Doctoral está dividida en varias secciones. En primer lugar, se hace un breve repaso de la embriología del ojo humano, para continuar con un recuerdo anatómico macro y microscópico de la superficie ocular. Seguidamente, se explica de forma abreviada en qué consiste el glaucoma y sus principales formas de tratamiento médico entre las que se encuentran los colirios de análogos de prostaglandinas. Se hablará también de farmacología ocular, haciendo hincapié en los conservantes más importantes, especialmente el cloruro de benzalconio, que se encuentra presente en varias de las presentaciones comerciales estudiadas en este trabajo. Asimismo, se explicarán diversos métodos para estudiar la viabilidad celular, algunos de los cuales se han utilizado en esta obra.

1. Anatomía e Histología

1.1. EMBRIOLOGÍA OCULAR

El desarrollo del ojo humano (Tabla 1 y Figura 1) comienza en torno a las 4ª semana de gestación, cuando a cada lado del cerebro anterior aparece una evaginación del neuroectodermo dando lugar a las *vesículas ópticas* que van migrando de forma anterior. Posteriormente, van cambiando de morfología, se invaginan y pasan de tener una forma esférica a otra en forma de “copa”, lo que se conoce como *cáliz óptico*. Este cáliz posee dos capas: una interna que recubre el interior y dará lugar a la retina y otra más externa con abundante melanina. Al principio, entre ambas capas se dispone el espacio intrarretiniano, pero éste va desapareciendo y las capas acaban yuxtaponiéndose (Sadler TW, 2007).

La invaginación del cáliz incluye la parte inferior formando la *fisura coroidea* por donde la células mesodérmicas se diferencian en la *arteria hialoidea* y, posteriormente en la *arteria central de la retina*. En la séptima semana, la fisura coroidea se va cerrando y fusionando hasta el margen de la cúpula óptica quedando un orificio libre que será la futura *pupila* (Sadler TW, 2007) (AAO, 2013).

Al mismo tiempo, el ectodermo superficial entra en contacto con la parte más anterior del cáliz, que se invagina y separa y da lugar a la *placa cristaliniiana*, que será el futuro cristalino que se dispone en el centro del cáliz óptico. El neuroectodermo vuelve a tapizar la superficie del cáliz lo que constituirá la eventual *córnea* (Barishak YR, 1992).

Desde la cresta neural salen oleadas de células mesenquimales que formarán parte del futuro endotelio corneal, el estroma y la esclerótica (Cuadrado Escamilla, 2008) (Sadler TW, 2007).

Origen	Estructura
Ectodermo superficial	Cristalino Epitelio corneal, conjuntiva y glándula lacrimal
Ectodermo neural	Humor vítreo Epitelio de la retina, iris y cuerpo ciliar Músculos del esfínter y dilatador pupilar Nervio óptico
Mesodermo	Esclerótica Tejido conjuntivo de córnea, cuerpo ciliar, iris y coroides Músculos extraoculares Tejido conjuntivo y vascular

Tabla 1. Origen embrionario de cada uno de los componentes del ojo humano.

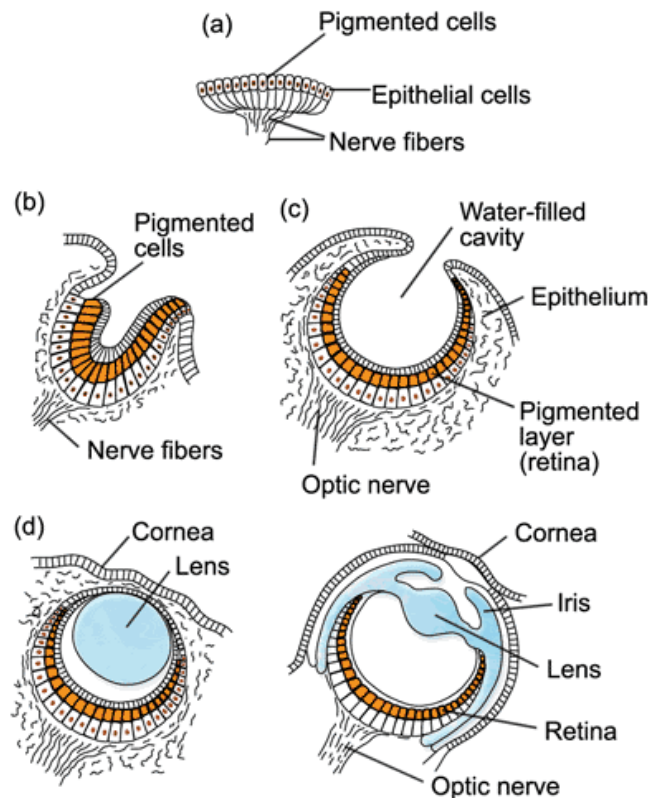


Figura 1. Diferentes fases del desarrollo embrionario del ojo humano. Dominio público (www.wikipedia.com).

1.2. ANATOMÍA DEL OJO

El globo ocular humano tiene forma casi esférica de aproximadamente 24 mm de diámetro y se pueden distinguir diversos componentes (Perea, 2006):

- Córnea
- Conjuntiva
- Esclerótica o esclera
- Cristalino
- Iris
- Coroides
- Retina
- Anejos oculares: párpados, glándulas y película lagrimal.

La conjuntiva y la córnea constituyen la *superficie ocular* y están en relación con el medio exterior. Actúan como barrera física y de defensa y su integridad es fundamental para el correcto funcionamiento del ojo. Los fármacos que se utilizan en Oftalmología son en su mayoría de acción tópica y se absorben a través de ambas estructuras.

1.2.1. Córnea

La córnea es una estructura avascular de tejido conectivo fibroso en contacto con el exterior. Por delante, se relaciona con la película lagrimal y, en su cara posterior, con la cámara anterior del ojo. Tiene un diámetro medio de 11-12 mm en sentido horizontal y 10-11 mm en sentido vertical. Su espesor medio central es de 540 micras, siendo la periferia ligeramente más ancha con 650 micras de espesor medio (Prakash G, 2012). Es de forma convexa en su cara externa y cóncava en la interna. La región central de la córnea, con un diámetro de 7,8 mm, se conoce como la *zona óptica* y tiene una forma casi esférica. La periferia es traslúcida y se recibe el nombre de *limbo esclero-*

corneal, tiene 1,5 mm de ancho y es donde confluye la conjuntiva, la córnea y la esclerótica.

La córnea desempeña varias funciones (Spalton DJ, 2006):

- Transmitir la luz con la mínima distorsión, dispersión y absorción.
- Refractar la luz que llega del exterior.
- Dar soporte estructural y protección del globo ocular sin comprometer la función óptica

Su principal característica es la transparencia, que consigue mediante una perfecta organización estructural de las fibras de colágeno. Transmite y refracta la luz que incide sobre ella y tiene un poder de refracción de +43 dioptrías (el 70% del poder refractivo total del ojo) (Puell Marín, 2006).

La córnea se nutre gracias al aporte de glucosa y nutrientes del humor acuoso y del oxígeno que difunde a través de la película lagrimal. La zona más periférica se nutre gracias a la vascularización perilímbica que proviene de la conjuntiva bulbar (Arffa, 1999).

Histología de la córnea humana

Clásicamente, se han distinguido en la córnea 5 capas bien diferenciadas (Figura 3): epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (AAO, 2013). Sin embargo, desde el año 2013, se ha identificado una 6ª capa localizada entre el estroma y la Descemet, conocida como la capa de Dua.

a) Epitelio

El epitelio corneal es un epitelio escamoso estratificado no queratinizado con aproximadamente 5-12 estratos celulares y 3 tipos diferentes de células: superficiales planas, alares poligonales y células basales columnares (Arffa, 1999).

Las *células superficiales planas* son las más externas y se disponen formando dos capas. Tienen forma hexagonal y se encuentran unidas entre sí mediante límites celulares rectos, formando unas uniones estrechas que impiden el paso de líquidos hacia el estroma corneal. Poseen numerosas microproyecciones que intensifican la adherencia de la película lagrimal al glucocáliz formando una superficie ópticamente lisa (Arffa, 1999).

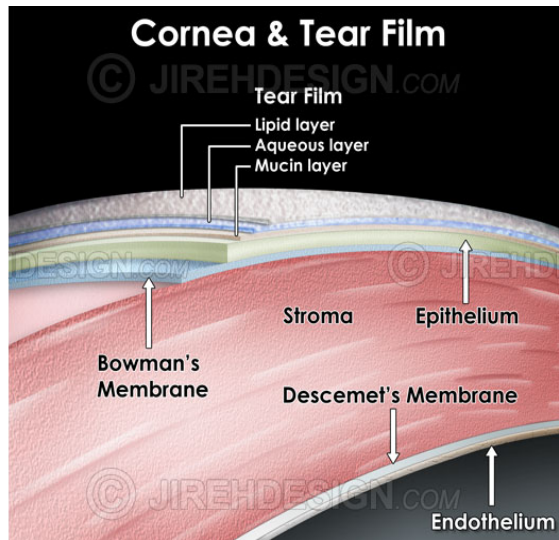


Figura 3: Corte esquemático de la cornea. Cortesía de Jireh Design

La *células alares* se disponen en tres capas. Su morfología varía en función de su localización en el espesor del epitelio siendo las más superficiales más planas (Harding CV, 1974).

Un poco más profundas se hayan las *células basales*, que se disponen como una monocapa sobre la membrana basal. Tienen una morfología redondeada y núcleos ovales perpendiculares a la superficie. Son células que se dividen por mitosis y que al madurar van migrando hacia el exterior convirtiéndose en células alares. Las células basales poseen tonofilamentos de actina que ayudan a la migración celular, lo que es de gran utilidad en los procesos de reparación de las heridas (Anderson RA, 1977) (Gipson IL, 1977). Intercaladas entra la monocapa de células basales, se encuentran otros tipos celulares como linfocitos o las células de Langerhans (células inmunes presentadoras de antígeno).

Las células epiteliales se unen entre sí utilizando microestructuras que, además, les proporciona una función de comunicación y de barrera. Así, se

encuentran abundantes uniones intercelulares tipo *desmosoma*; uniones estrechas o *tight junctions* lo que les proporciona una gran cohesión y estabilidad; y uniones *gap* que permiten el paso de pequeñas moléculas entre unas células y otras (del Buey Salas, 2014).

Al microscopio, se observa una matriz densa llena de queratofibrillas finas. Los microorganelos son más evidentes en las células basales que en las alares o superficiales. Las mitocondrias son pequeñas y escasas en número (Arffa, 1999).

A lo largo de la vida, hay un constante recambio de células epiteliales (Figura 4). Las células madre del epitelio corneal se localizan en nichos en el limbo corneal. Esta región se caracteriza por invaginaciones del estroma que se disponen radialmente y se conocen como *empalizadas de Voght*. Las empalizadas tienen un rico aporte vascular que aporta señales químicas, permite interacciones epitelio-mesénquima y actúa de reservorio que protege a las células madre de traumatismos y del medio ambiente (Castro-Muñozledo F, 2013).

Cuando este proceso se encuentra alterado, se pueden producir opacificaciones y visión borrosa (Kinoshita S, 2001).

Por debajo, se encuentra la membrana basal del epitelio que facilita la adhesión de las células epiteliales junto a los hemidesmosomas y fibrillas de anclaje. Se compone de colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, fibrina y antígeno penfigoide ampolloso, entre otros componentes (Madrid JA, 1980) (Millin JA, 1986) (Gipson IK, 1987).

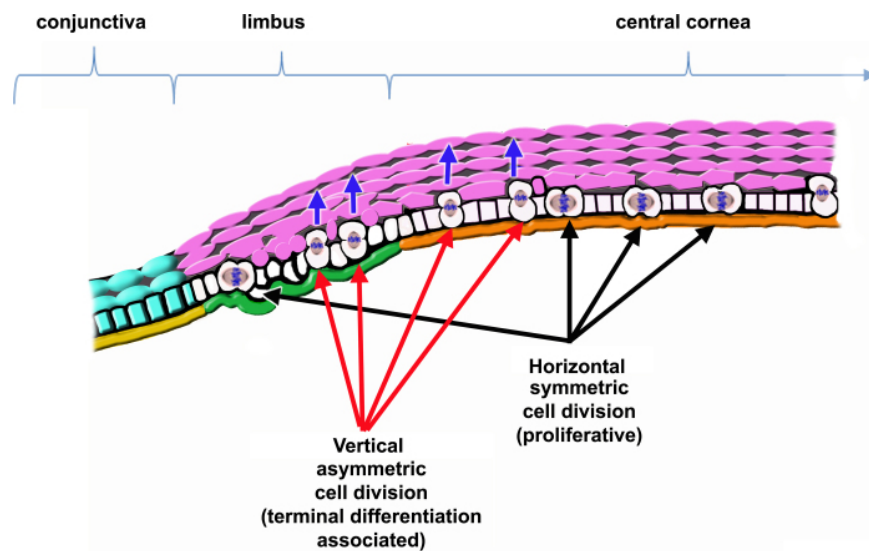


Figura 4. Representación del recambio epitelial corneal. Las células madre van dividiéndose en sentido horizontal por encima de la membrana basal. Algunas permanecen allí, manteniendo funciones proliferativas, pero otras migran al compartimento suprabasal y van diferenciándose hasta convertirse en células maduras (Castro-Muñozledo F, 2013).

b) Capa de Bowman

Se suele describir como una condensación acelular del estroma anterior de la córnea. Con un espesor de 10 μm está compuesta por fibrillas de colágeno cortas dispuestas al azar de los tipos I, III y V. Aparece en torno a la semana 13-19 de la gestación (Pouliquen Y, 1966) (Sevel Disaacs R, 1988). Algunas investigaciones sugieren que el epitelio corneal juega un papel importante en la formación de la capa de Bowman (Gordon MK, 1994). De hecho, parece que su formación depende de interacciones mediadas por interleucinas entre las células del epitelio y los propios queratocitos del estroma anterior lo que incluiría procesos apoptóticos y quimiotácticos en los queratocitos (Wilson SE, 2000). Cuando se lesiona, no se llega a recuperar completamente si no que aparece otra capa más adelgazada que no alcanzará el espesor inicial (Kass-Hansen M, 1993).

Es una capa caso exclusiva del ser humano, primates y algunas aves (del Buey Salas, 2014). La función exacta de la capa de Bowman es todavía confusa. Algunos investigadores defienden que actúa como ligamento que mantiene la estructura corneal. Otros trabajos apuntan hacia una función defensiva que dificultaría la infección de las células epiteliales por virus, como el del herpes. Al ser una barrera acelular, podría funcionar como una dique biológico ya que los virus requieren de células para su propagación y extensión. En cualquier caso, su función parece no ser crítica como sugiere el hecho de que tras cientos de miles de procedimientos fotorrefractivos llevados a cabo en las últimas décadas no haya un número elevado de complicaciones pese a su ablación manteniéndose la claridad corneal y la adherencia celular (Wilson SE, 2000). También se ha observado que hay individuos sin capa de Bowman de forma congénita. Estos sujetos tienen una córnea transparente y sin otras alteraciones (Gordon MK, 1994). Existen estudios que han mostrado un adelgazamiento progresivo con la edad de hasta 1/3 de su espesor entre los 20 y 80 años (Germundsson J, 2013).

c) Estroma

Es un tejido conjuntivo que se caracteriza por su transparencia. Supone el 90% del espesor corneal y está formado por agua en un 80% y por fibras de colágeno, células estromales y sustancia fundamental (AAO, 2013).

La fibras de colágeno suponen el 80% del peso seco del estroma y son fibras que se disponen organizadas de forma constante en su orientación y tamaño, algunas paralelas a la superficie y otras perpendiculares, manteniendo una regularidad que es muy importante para lograr la transparencia corneal. Los tipos de colágeno del estroma son tipo I, III, V y VI. Son las fibras de colágeno con el diámetro más corto del organismo (200-300 Å) (Arffa, 1999).

En el estroma hay más de 200 capas o lamelas, las cuales aparecen más entrelazadas en la parte más superficial, pero a medida que se profundiza,

las lamelas van haciéndose más gruesas, apiladas y variadas. El espacio entre cada lamela es de 0,2-0,5 μm . Las fibras de colágeno aparecen alineadas en la misma dirección y rodeadas de proteoglicanos.

La sustancia fundamental rodea a las fibras de colágeno y está formado por proteoglicanos y otros componentes minoritarios. Los tipos más frecuentes son la decorina y el lumicán. Los proteoglicanos son muy importantes porque mantienen la posición y el ordenamiento regular de los haces de colágeno y, por ende, la transparencia corneal (Knupp C, 2009).

El queratocito es la célula más importante del estroma y sintetiza tanto el colágeno como los proteoglicanos. Son células muy activas con abundantes mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi (Kuwabara T, 1978). Cuando se lesiona el estroma, emigran a la herida y se convierten en fibroblastos o miofibroblastos. Además, podemos encontrar otros tipos celulares como polimorfonucleares, células plasmáticas y macrófagos (Quantock AJ, 2008).

d) Capa de Dua

Recientemente descrita, se dispone entre el estroma corneal y la membrana de Descemet. Tiene tan solo 15 μm de espesor, y se compone fundamentalmente de haces de colágeno organizados en láminas muy apretadas (Dua HS, 2013). Destaca por su resistencia e impermeabilidad al aire. Su descubrimiento puede contribuir a una mejor comprensión de la biomecánica corneal y de la patología corneal posterior, y por consiguiente, abre la puerta a nuevos tratamientos y procedimientos quirúrgicos.

e) Membrana de Descemet

Es una fina membrana con un espesor de 10 μm . Mediante ensayos con inmunohistoquímica se ha demostrado que contiene fibronectina, fibras

colágeno tipo IV, y fibras del tipo VIII que se distribuyen como una empalizada hexagonal (Shuttleworth CA, 1997). En la periferia, aparecen engrosamientos localizados de la membrana de Descemet, que reciben el nombre de *Hasal-Henle*.

Al nacer, la membrana tiene un espesor 3 μm y presenta un aspecto estriado. Con el paso de los años va aumentando el grosor y perdiendo sus estrías (Spalton DJ, 2006). Aunque algunos estudios han arrojado resultados contradictorios y muestran un progresivo adelgazamiento con la edad (Beuerman RW, 1996).

A diferencia de la capa de Bowman, se desprende del estroma con facilidad y, además, es capaz de regenerarse si se lesiona. En algunas patologías se produce un acúmulo de material a este nivel, como el cobre en la enfermedad de Wilson y la plata en la argirosis (Arffat RC, 1999).

f) Endotelio

Es una monocapa de células epiteliales hexagonales con una densidad de 3.500-4.000 células/ mm^2 al nacer, cuyo número va disminuyendo paulatinamente con la edad. Su densidad es mayor en la región paracentral y en periferia (Amann J, 2003). Por lo general, estas células carecen de propiedades regenerativas en el adulto. Juegan un papel muy importante controlando la hidratación del estroma y evitando un excesivo acúmulo de agua y edema que comprometería la transparencia corneal y dificultaría la visión. Cuando hay una pérdida celular importante, las que sobreviven aumentan de tamaño y pueden mantener su función hasta densidades de 500-700 células/ mm^2 (del Buey Salas, 2014).

1.2.2. Limbo

Es la zona anatómica altamente vascularizada de transición entre la esclera, la córnea y la conjuntiva. En la periferia, el estroma corneal va perdiendo su transparencia gradualmente y las lamelas aparecen más desordenadas. Los haces de colágenos son más heterogéneos, aumentando en su tamaño y variando en su diámetro y orientación de forma progresiva para asemejarse cada vez más al colágeno de la esclera. La capa de Bowman finaliza en el limbo central y da origen a tejido conjuntivo fibroso del que se desarrollan papilas subepiteliales. El epitelio de la córnea aumenta de espesor hasta aproximadamente 12 capas celulares y proyecta radialmente unas líneas que se conocen como *empalizadas de Voght*, que son visibles macroscópicamente (Arffa, 1999).

El limbo es muy importante por ser el lugar donde se asientan las células madre que regeneran el epitelio corneal (Castro-Muñozledo F, 2013). Éste es un proceso que sucede de forma continua. Las células epiteliales migran desde la periferia de la córnea en el limbo hacia el interior de la córnea. En algunas patologías que afectan al limbo como el síndrome de Stevens-Johnson o en traumatismos químicos, la capacidad regenerativa se ve mermada y aparecen erosiones y úlceras corneales.

Por debajo del limbo se encuentra el *trabéculo* y el *canal de Schlemm*, que es lugar por donde el humor acuoso es reabsorbido y drenado. Es un área de mucha importancia en enfermedades oculares como el glaucoma (AAO, 2013).

1.2.3. Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que se extiende desde el limbo esclero-corneal hacia el borde libre de los párpados. Tapiza el globo ocular y la cara interna de los párpados. Se desarrolla a partir del tercer

mes de gestación y deriva mayoritariamente del ectodermo. La conjuntiva permite el correcto movimiento del globo ocular y colabora en la formación de moco y lágrima. Una conjuntiva sana es fundamental para mantener el correcto funcionamiento del ojo. Contribuye al mantenimiento de un medio adecuado para que a córnea actúe correctamente y desarrolle su función refractiva (del Buey Salas, 2014).

La conjuntiva se divide en tres partes diferenciadas (Figura 5):

- **Conjuntiva bulbar:** recubre el globo ocular y la esclera. Se encuentra separada de ella por la cápsula de Tenon, formada por tejido conjuntivo laxo. Las crestas radiales en el limbo forman las *empalizadas de Voght* que contienen las células germinales corneales.
- **Conjuntiva del fórnix:** está suelta y redundante y tapiza los fondos de saco superior e inferior. A este nivel se sitúa también las *glándulas de Krause*.
- **Conjuntiva tarsal o palpebral:** se extiende desde el borde posterior de las glándulas de Meibomio cubriendo la parte interna de los párpados a los que está bien adherida. Además también se localizan las *glándulas de Henle y Wolfring* que contribuyen a lubricar la superficie ocular.

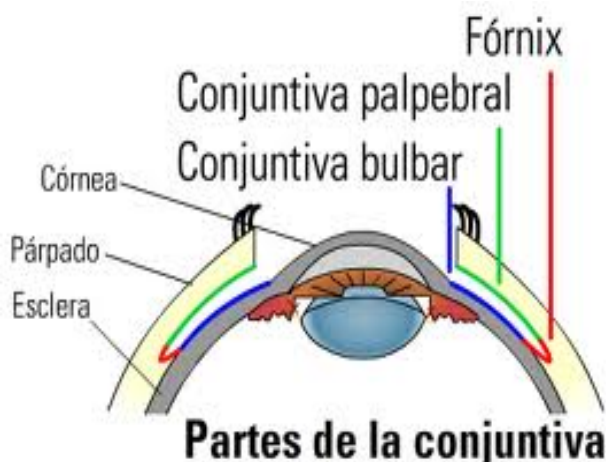


Figura 5. Esquema de las diversas partes de la conjuntiva. Tomado de <http://saludvisual.info>

Por otro lado, en la conjuntiva existen dos estructuras anatómicas especiales de interés (Arffa, 1999):

- **El pliegue semilunar o plica seminularis** se encuentra medialmente y es un pliegue que une los fórnices superior e inferior y es útil en los movimientos de abducción del ojo.
- **La carúncula** se encuentra medial al pliegue semilunar y es un tejido modificado que contiene pelos, glándulas sebáceas, sudoríparas y lagrimales de Krause y un epitelio superficial no queratinizado.

La conjuntiva lleva a cabo su función excretora mediante las células caliciformes, que suponen aproximadamente el 10% de las células basales del epitelio y sintetizan material mucinoso que forma parte de la película lagrimal; por otra parte, la conjuntiva es, además, una barrera defensiva física frente a la infección y una fuente de células inflamatorias (Arffa, 1999).

La película lagrimal es fundamental para el mantenimiento del segmento anterior ocular y en definitiva para preservar la córnea en unas condiciones de transparencia óptima, lo que redundará en una adecuada transmisión de la luz que llega en buenas condiciones a la retina (AAO, 2013).

Por otro lado, la conjuntiva tiene un aporte linfático denso y abundantes células inmunocompetentes, especialmente en los fondos de saco. Los linfocitos interactúan con las células epiteliales mediante citoquinas, factores de crecimiento y neuropéptidos. El drenaje linfático se dirige hacia los ganglios preauriculares y submandibulares (Perea, 2006).

Histología de la conjuntiva humana

La conjuntiva se compone de una capa epitelial y una capa de tejido conectivo (lámina propia submucosa). En función de la zona de conjuntiva considerada, el epitelio va cambiando. A nivel del margen palpebral, alrededor del limbo y en la periferia del tarso palpebral, la conjuntiva está constituida por un epitelio escamoso estratificado. El resto de conjuntiva presenta 2-5 capas de células epiteliales, células basales cuboideas, células cilíndricas superficiales y células poliédricas.

Además, en toda la conjuntiva se encuentran *células caliciformes* que sintetizan moco, el cual es fundamental para permitir el deslizamiento de la conjuntiva y el movimiento del globo ocular. Estas células presentan forma redondeada u ovalada y en su interior almacenan grandes cantidades de mucina. Su población es más densa a nivel del tarso y en la *plica semilunaris*, donde pueden llegar al 5-10% de las células basales (Arffat RC, 1999) (Perea, 2006) (Barishak YR, 1992) (AAO, 2013).

1.2.4. Esclera

La esclerótica o esclera es una capa del ojo formada por tejido conectivo que se extiende desde el limbo hacia atrás formando una esfera atravesada en su parte posterior por el nervio óptico. Tiene un diámetro de unos 22-24 mm y un espesor variable que oscila según la zona. En el limbo alcanza los 0,8 mm, 0,4-0,5 en el ecuador y 1 mm en la región próxima al nervio óptico (AAO, 2013).

Su composición es parecida a la de la córnea. Se encuentran fibras de colágeno sobre todo del tipo I, pero también de los tipos III, V y VI. Sin embargo, su disposición no es regular: las haces tienen diámetro variable y se

entrelazan irregularmente. Como consecuencia, la esclera no es un tejido transparente (Arffa, 1999).

La sustancia fundamental de la esclera tiene proteoglicanos, principalmente dermatán sulfato, pero también condroitín sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico.

Anatómicamente, se pueden diferenciar tres zonas o capas en la esclera:

- **Epi-esclera:** es la capa fibrovascular más superficial
- **Estroma escleral.**
- **Lámina fusca:** es más oscura, debido a su contenido en melanocitos. Sus haces de colágeno atraviesan el espacio supracoroideo, lo que da una adherencia débil entre la esclera y la coroides.

1.2.5. Película lagrimal

La lágrima es secretada en un 95% por las *glándulas lagrimales principales* y el resto es producido por las *glándulas lagrimales accesorias de Krause y Wolfring*. La película lagrimal juega un papel muy importante en el funcionamiento normal del ojo y su función visual. En individuos sanos, la lágrima se compone fundamentalmente de agua, electrolitos, lípidos, proteínas, glucosa y mucinas. Sin embargo, en algunas patologías sus componentes se distribuyen de forma desequilibrada o aparecen otros elementos como antígenos, citoquinas o mediadores inflamatorios (Najafi L, 2015) (Yeh TN, 2015).

La película lagrimal se compone de 3 capas mal definidas):

- **Capa lipídica externa:** tiene 0,1 μm de espesor y es secretada por las glándulas de Meibomio localizadas en el borde palpebral. Su

función es retrasar la evaporación de lágrima, disminuir la tensión superficial y lubricar los párpados.

- **Capa acuosa intermedia:** de 7-10 μm de espesor. Aporta oxígeno al epitelio corneal, tiene también una función defensiva, al contener lisozima, lactoferrina e IgA; y una función visual, al homogenizar la superficie ocular, lo que contribuye a tener una mejor imagen retiniana, suavizando las irregularidades de la superficie.

- **Capa interna de mucina:** de 0,8 μm de espesor, es secretada por las células caliciformes conjuntivales, las criptas de Henle y las glándulas de Manz. Esta capa humidifica el epitelio corneal y lubrica la superficie ocular.

2. Glaucoma

2.1. CONCEPTO

El glaucoma es una neuropatía óptica crónica progresiva que se caracteriza por cambios en la papila óptica (Figura 6), una pérdida de fibras nerviosas y muerte de células ganglionares retinianas, lo que conduce a una pérdida progresiva del campo visual (Figura 7) (Tuulonen A, 2003).

Optic nerve head cupping progression

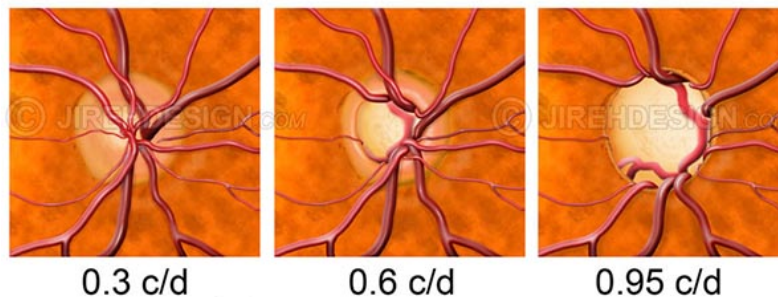


Figura 6. Imágenes del nervio óptico. Se observa la excavación característica del glaucoma, expresada como relación copa/disco (c/d). Cuanto mayor es este índice, mayor el daño. La de la izquierda es normal y la derecha muestra un daño avanzado. Cortesía de Jireh Design.

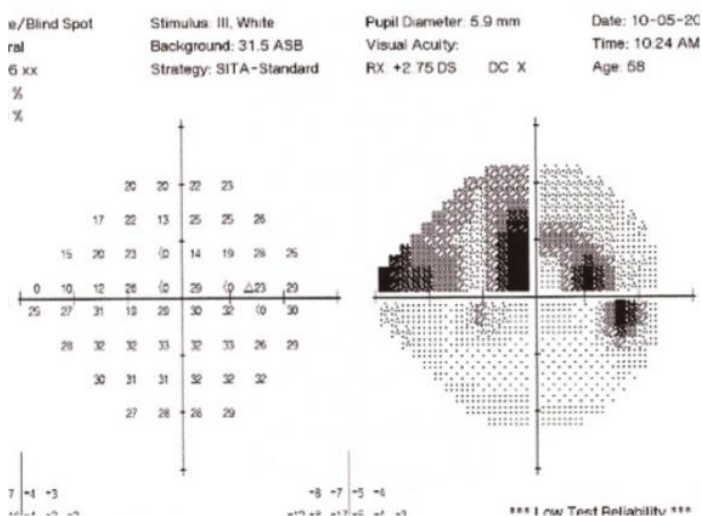


Figura 7. Campo visual con glaucoma. Se observa el defecto de sensibilidad en forma de arco muy típico de esta patología.

La presión intraocular (PIO) elevada y los antecedentes familiares son factores de riesgo conocidos en el glaucoma (Kanski, 2004). Afecta globalmente a más de 60 millones de personas, siendo la segunda causa más frecuente de ceguera tras las cataratas (Kingman, 2004). Su prevalencia está aumentando debido al envejecimiento progresivo de la población y se estima que para el año 2020, afectará a 79,6 millones de personas en todo el mundo (Quigly HA, 2006). El 2,4% de los sujetos de más de 40 años padece glaucoma, y esta cifra aumenta por encima del 7% en individuos de más de 70 años (Heijil A L. M., 2002). En la mayoría de los países desarrollados se calcula que la mitad de los pacientes que tienen glaucoma permanecen sin diagnosticar (Grodum K, 2002) (Quigley HA, 2003). Además, genera un gasto sanitario de alrededor de 2,5 millones de dólares al año en Estados Unidos con un coste estimado de entre 600 a 2.500 dólares por persona y año (Lee PP, 2006). Pero, aunque se puede medir el coste médico del tratamiento del glaucoma, el coste general que produce en términos de déficit visual y ceguera es más difícil de medir (Waisbourd M, 2015). Por ejemplo, el uso de medicación tópica ocular y la pérdida campimétrica se asocia a mayor riesgos de caídas y fracturas en pacientes ancianos (Glyn RJ, 1991). Otros estudios han constatado que el glaucoma es factor de riesgo independiente de accidentes de tráfico en sujetos entre los 55 y los 87 años (Owsley C, 1998).

2.2. PRESIÓN INTRAOCULAR (PIO)

La presión intraocular es la tensión que ejercen los líquidos oculares contra la pared del ojo y su valor viene determinado por la relación entre la producción de humor acuoso y su reabsorción (Kanski, 2004).

El *humor acuoso* es producido de forma continua por el cuerpo ciliar que, a través de la *pars plicata*, emite unos 70 *procesos ciliares* que se orientan de forma radial hacia la cámara posterior de ojo. Cada proceso está recubierto por una capa de epitelio pigmentario de la retina y una capa epitelial no

pigmentada continua con la neurorretina. Las fuertes uniones entre las células epiteliales no pigmentadas forman la barrera sangre-humor acuoso. El humor acuoso es secretado por estas células no pigmentadas por un proceso metabólico activo de varios tipos con predominio de la bomba Na^+/K^+ ATPasa que secreta iones de Na^+ hacia la cámara posterior, lo que se acompaña de agua por gradiente osmótico (Kanski, 2004)

El humor acuoso tiene diversas funciones: mantiene la PIO lo que es fundamental para sustentar la estructura y buen funcionamiento ocular; además, aporta soporte metabólico a estructuras avasculares intraoculares como el cristalino, la córnea y la malla trabecular, a las que aporta glucosa, oxígeno y aminoácidos. Igualmente, retira desechos celulares como el ácido láctico y dióxido de carbono (Morrison JC, 2003).

El humor acuoso sigue un circuito dentro del ojo (Figura 8): es secretado en la cámara posterior del ojo y, a través de la pupila, alcanza la cámara anterior (espacio situado entre la cara externa del iris y la cara interna de la córnea), donde es drenado por dos vías diferentes:

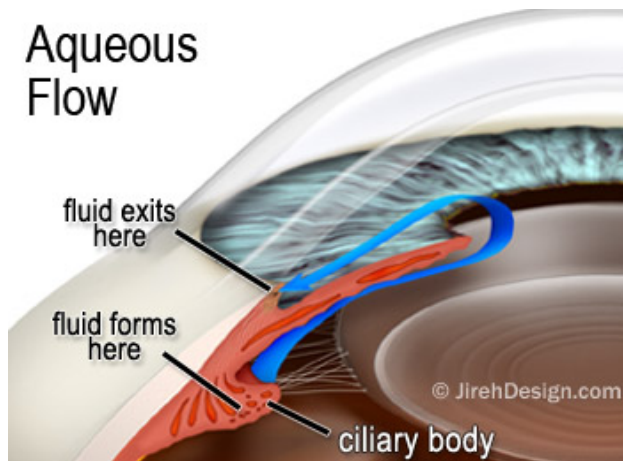


Figura 8. Circuito del humor acuoso dentro del ojo. Cortesía de Jireh Desing.

- **Vía trabecular:** es la más importante, pues drena el 90% de humor acuoso. Desde el trabéculo, fluye hacia el canal de Schlemm y luego, a las venas episclerales.

- **Vía úveoescleral:** drena el 10% restante. El cuerpo ciliar drena hacia el espacio supracoroideo, donde es eliminado por el sistema venoso del cuerpo ciliar, coroides y esclerótica.

Por tanto, el humor acuoso es sintetizado, renovado y reabsorbido de forma constante. Se puede producir un desequilibrio porque haya un exceso de formación o por un bloqueo o resistencia a su reabsorción. Cuando esto ocurre, las cifras de presión intraocular aumentan poniendo en peligro el funcionamiento normal del ojo (Kanski, 2004).

Se consideran cifras normales de PIO en la población general las comprendidas entre 11 y 21 mmHg, con un valor medio de 16 mmHg. Estas cifras se han establecido de forma estadística y no se pueden aplicar a un individuo concreto. El límite alto de la normalidad se sitúa en 21 mmHg, pero se puede producir daño glaucomatoso con cifras inferiores; o podemos encontrar individuos que con cifras superiores a 30 mmHg no desarrollan nunca glaucoma (Kanski, 2004).

La PIO tiene un valor fluctuante y se ve influenciada por el momento del día, el latido cardiaco, la presión arterial y la respiración. Esta variación diaria es de unos 5 mmHg en individuos sanos pero es mayor en pacientes glaucomatosos. El 80% de los pacientes tiene máximos entre las 8 y 12 horas. (Kanski, 2004) (Tan S, 2015).

2.3. CLASIFICACIÓN

Existen diferentes clasificaciones para el glaucoma atendiendo a diferentes criterios. La Sociedad Europea de Glaucoma clasifica el glaucoma en cinco grupos (European Glaucoma Society, 2008):

1) Formas congénitas primarias

- a. Glaucoma congénito o infantil
- b. Glaucoma asociado a anomalías congénitas:
 - i. Goniodisgenesias: síndrome Axenfeld-Rieger; anomalía de Peter.
 - ii. Síndrome Sturge-Weber

- iii. Aniridia
- iv. Neurofibromatosis
- v. Síndrome de Marfan
- vi. Síndrome Pierre Rodin
- vii. Homocistinuria
- viii. Síndrome de Lowe
- ix. Microesferofaquia
- x. Microcórnea
- xi. Rubeola
- xii. Anomalías cromosómicas
- xiii. Síndrome del pulgar ancho
- xiv. Vítreo primario hiperplásico primario

2) Glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA)

- a. Glaucoma juvenil primario
- b. GPAA con PIO elevada
- c. GPAA con PIO normal
- d. Sospecha de GPAA
- e. Hipertensión ocular

3) Glaucoma secundario de ángulo abierto (GSAA)

- a. Causados por enfermedades oftalmológicas
 - i. Glaucoma exfoliativo
 - ii. Glaucoma pigmentario
 - iii. GSAA inducido por cristalino
 - iv. Glaucoma asociado a hemorragia intraocular
 - v. Glaucoma uveítico
 - vi. Glaucoma secundario a tumores intraoculares
 - vii. Glaucoma asociado a desprendimiento de retina
 - viii. GSAA debido a trauma ocular
- b. Glaucomas secundarios de ángulo abierto iatrogénicos
 - i. Glaucoma debido a tratamiento esteroideo
 - ii. GSAA debido a láser y cirugía ocular

c. Glaucoma secundario de ángulo abierto por enfermedades extraoculares:

i. Glaucoma por aumento de presión venosa episcleral

4) Glaucoma primario por cierre angular (GPCA)

a. GPCA

i. Cierre angular agudo

ii. Cierre angular intermitente

iii. Cierre angular crónico

iv. Secuelas o *status* tras ataque agudo de cierre angular

b. Ángulo ocluíble o riesgo de cierre angular

5) Glaucoma secundario por cierre angular (GSCA)

a. Cierre angular secundario por bloqueo pupilar

b. Cierre angular secundarios por mecanismo de tracción anterior sin bloque pupilar

c. Cierre angular secundario por mecanismo de “empuje” posterior sin bloque pupilar

i. Glaucoma por una dirección acuosa inadecuada (bloqueo ciliar maligno)

ii. Quiste de iris y cuerpo ciliar, tumores intraoculares

iii. Aceite de silicona o gas implantados en I cámara vítrea.

iv. Efusión foveal

v. Retinopatía de la prematuridad (estadio V)

vi. Anomalías congénitas que pueden asociarse a glaucoma secundario.

Esta clasificación propuesta por la Sociedad Europea de Glaucoma es demasiado compleja. A efectos prácticos y para simplificar se suele distinguir entre formas *primarias* cuando no existe otra enfermedad ocular o sistémica que lo cause; y formas *secundarias* cuando sí las hay. Además se suele hacer referencia a la morfología del ángulo iridocorneal distinguiéndose ángulos *abiertos* o *cerrados*.

El **glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA)** también se conoce como glaucoma crónico simple es el tipo de glaucoma que más se ven en nuestro medio. Se caracteriza por iniciarse en la vida adulta, el ángulo iridocorneal está abierto y de aspecto normal; el nervio óptico presenta signos de daño glaucomatoso y se objetiva una pérdida en el campo visual. La mayoría de los individuos presentan PIO por encima de 21 mmHg (aunque puede haber GPAA con cifras inferiores como en el glaucoma normotensivo)

El **glaucoma primario con cierre angular primario (GPCA)** es más frecuente en la población asiática. El cierre angular implica el contacto entre el iris y la cara posterior de la córnea como resultado de un segmento anterior comprimido; lo que dificulta el drenaje del humor acuoso y el consiguiente aumento de la PIO que define un cuadro clínico característico que requiere tratamiento urgente.

2.4. FACTORES DE RIESGO

Aunque el principal factor de riesgo es el incremento de la PIO (European Glaucoma Society, 2008), según el tipo de glaucoma podemos encontrar otros factores importantes:

1. Glaucoma primario de ángulo abierto

Se han identificado diversos factores de riesgo para el desarrollo de glaucoma primario de ángulo abierto: raza negra (Tielsch JM, 1991), presión sistólica elevada, tabaquismo, antecedentes familiares de glaucoma, diabetes mellitus (Katz J, 1988), miopía y el más importante: PIO elevada (Wilson MR, 1987) (Nanglia V, 2013). Además existen factores genéticos y ambientales que influyen en su genotipo (Fan BJ, 2004) (Gemenetzi M, 2012).

2. Glaucoma primario de ángulo cerrado

En el caso del glaucoma primario de ángulo cerrado (GPAC), también se han identificado algunos factores de riesgo. La raza esquimal y china tiene un riesgo relativo 20 ó 40 veces superior a los caucásicos (Congdon N, 1992) mientras que es muy raro en la población negra. A mayor edad mayor riesgo de padecer GPAC debido al crecimiento en sentido antero-posterior que sufre el cristalino lo que empuja el iris hacia delante (Tomlinson A, 1973). Las mujeres son más susceptibles que los hombres aunque la causa no está clara (Seah SKL, 1997). También se ha encontrado en pacientes hipermétropes un mayor riesgo (Erie JC, 1997). Los antecedentes familiares son otro aspecto importante para el GPAC según diversos estudios (Congdon N, 1992) (Alsbirk PH, 1976).

2.5. TRATAMIENTO

El tratamiento del glaucoma se debe abordar de forma individualizada para cada paciente en particular, según las necesidades y el riesgo de progresión de la enfermedad. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de ceguera son la gravedad de la enfermedad en el momento del diagnóstico y la esperanza de vida (Martus P, 2005). Los pacientes con daño glaucomatoso más severo y, aquéllos que tienen una esperanza de vida más alta, requieren tratamiento más agresivo y seguimiento más frecuente (Chauhan BC, 2008) (Broman AT, 2008).

En la práctica clínica diaria, el único parámetro sobre el que podemos actuar para evitar que aparezca o progrese la enfermedad es la tensión ocular (PIO) (Kass MA, 2002) (Heijil A L. M., 2002) (The Glaucoma Laser Trial (GLT), 1995). Al aumentar la PIO, se produce un descenso de la presión de perfusión vascular ocular, lo cual podría disminuir la llegada de sangre al nervio óptico, lo cual a su vez depende en gran medida de la tensión arterial sistémica (Gheghel D, 2000) (Flammer J, 2002) (Grieshaber MC, 2007). Se ha observado que la tensión diastólica baja en pacientes ancianos se asocia a mayor progresión del

daño glaucomatoso (McGlynn MM, 2013) (Okumura Y, 2012). Otros vías de investigación abiertas en la actualidad tratan sobre la neuroprotección mediante compuestos que puedan proteger del daño neuronal (Danesh-Meyer HV, 2011) (Weinreb RN, 1999) o regenerar las células ganglionares de la retina mediante fármacos inhibidores de la ρ -quinasa (Van de Velde S, 2015) (Tanihara H, 2015).

Para conseguir la reducción de la PIO tenemos en la actualidad las siguientes opciones:

- Tratamiento médico.
- Tratamiento láser.
- Tratamiento quirúrgico.

La elección de qué tratamiento es el más indicado para cada paciente depende del médico. Se han de tener en cuenta diversos factores, algunos en relación a la enfermedad, como el tipo de glaucoma, grado de daño glaucomatoso y esperanza de vida; y otros factores relacionados con la terapia como son la potencia hipotensora, su tolerabilidad, el coste y su cumplimiento (European Glaucoma Society, 2008) (Burr J, 2012). En la actualidad, la terapia más empleada es el tratamiento médico con colirios hipotensores, entre los que destacan los análogos de prostaglandinas. La presente Tesis Doctoral se va a centrar en estudiar el tratamiento médico y, más concretamente, en la citotoxicidad, de los análogos de las prostaglandinas en las células conjuntivales humanas.

3. Farmacología

3.1. FARMACOCINÉTICA OCULAR

En el ojo humano hay aproximadamente 7 μ l de película lagrimal, con una tasa de recambio de 1 μ l por minuto. Esta cantidad se duplica cuando se usan fármacos tópicos. De tal forma que, después de 5 minutos tras instilar un colirio, se produce un lavado completo de la lágrima (European Glaucoma Society, 2008).

La absorción local de fármacos en el estroma corneal o en el humor acuoso va a depender de dos factores: de la concentración que alcance en la superficie ocular y del tiempo de contacto (Bourlais CL, 1998) .

Tras la administración de un colirio en el ojo, el fármaco es inicialmente mezclado con la lágrima. Una gota de un colirio contiene 30-50 μ l, pero tan solo entre el 5 y el 20% del fármaco penetra en la córnea y la esclera alcanzando los tejidos intraoculares. El 80% restante se elimina por el conducto lacrimal o sale fuera por la mejilla. En la mayoría de los casos, el tiempo de contacto del medicamento con la superficie ocular es corto (1 ó 2 minutos) debido al recambio lagrimal. El ojo es capaz de retener un volumen extra de 25 μ l, pero el parpadeo o el cierre fuerte de los párpados que sigue a la instilación no suele permitirlo. Además, la medicación se diluye en la lágrima hasta el 25% de la concentración que se instiló (Maurice DM, 2002). Tras la mezcla con la lágrima inicial, el medicamento se diluye progresivamente por el recambio lagrimal constante. Además, según las características del fármaco, este reemplazo puede ser aun más rápido si éste es irritante, ya que se aumentará la secreción de lágrima refleja. Esta irritación depende del pH y de la osmolaridad del fármaco, pues cuanto más diferente sea el fármaco a la lágrima, mayor será la secreción de lágrima.

Otro factor que afecta negativamente a la biodisponibilidad del colirio es el hecho de que las lágrimas contienen proteínas y mucinas que se unen a las moléculas del fármaco, lo cual podría reducir la concentración efectiva del medicamento en contacto con la superficie ocular (Bourlais CL, 1998).

La absorción sistémica es escasa en general, pero en la mayoría de los casos, es indeseada. Ésta se produce por la filtración de la mucosa nasal que está profusamente vascularizada y la conjuntival. La instilación de una gota de timolol 0,5% puede seguirse de una concentración sérica de timolol que iguala la ingesta de una tableta de 10mg (Korte JM, 2002). Para minimizar la absorción sistémica, los pacientes han de ser instruidos en la oclusión del punto lagrimal inmediatamente después de la instilación del colirio y durante varios minutos (Aritürk N, 1996).

El principal problema que tiene la administración de colirio es que la mayoría de fármaco es eliminado de forma rápida, y tan solo un 5% penetra la córnea y alcanza tejidos intraoculares, mientras que una buena parte es absorbida sistémicamente a través de la conjuntiva y el saco lagrimal (Bourlais CL, 1998).

La penetración del fármaco hacia el estroma corneal y el humor acuoso requiere el paso a través del epitelio y del estroma corneal, que actúan como barreras con características distintas. Por una parte, el epitelio es una barrera celular con gran cantidad de membranas lipídicas, por lo que sustancias no polares o lipofílicas penetraran fácilmente; por otro lado, el estroma se compone principalmente de agua y fibras de colágeno, por lo que las sustancias polares lo atravesarán con facilidad y las lipofílicas con dificultad. Los medicamentos deben de atravesar ambas estructuras para llegar al interior del ojo (Bourlais CL, 1998) (Arffat RC, 1999). El epitelio de la córnea puede ser atravesado por dos posible vías: las transcelular, que es la preferida por las sustancias lipofílicas, y la vía paracelular, que es utilizada sobre todo por moléculas hidrofílicas. La penetración del fármaco se ve obstaculizada por la

unión de medicamento al tejido corneal. De hecho, incluso la córnea podría actuar como un reservorio liberando lentamente el fármaco al humor acuoso (Romanelli L, 1994) (Bourlais CL, 1998).

El tamaño de las moléculas también es otro elemento determinante, ya que sólo pueden penetrar aquéllas que tienen un tamaño menor a 50 KDa (Rabinovich-Guillat L, 2004)

Por tanto, la permeabilidad corneal dependerá de las propiedades físico-químicas del fármaco como la liposolubilidad, solubilidad, forma y tamaño molecular, carga y grado de ionización (Bourlais CL, 1998).

Muchos medicamentos oftálmicos son bases débiles. Éstas tienden a penetrar bien, porque están en equilibrio entre la forma iónica y la forma neutra. La forma neutra penetra bien el epitelio; una vez en el estroma, el equilibrio se desplaza a favor de la forma iónica. Los iones pueden atravesar el estroma hacia el endotelio, donde tiene lugar el proceso inverso (Arffa, 1999).

Algunas circunstancias pueden modificar la absorción corneal. Cuando el epitelio de la córnea está dañado debido a traumatismos, úlceras o abrasiones, los medicamentos hidrofílicos son más eficaces. La inflamación también aumenta la penetración.

El cloruro de benzalconio (BAK) es uno de los conservantes más utilizados en la oftalmología. Produce un daño en el epitelio, lo que facilita también la penetración del fármaco al interior del ojo. Sin embargo, la presencia de éste o de otros conservantes podría tener algún efecto citotóxico sobre la superficie ocular (Baudouin C, 2010). Por este motivo, trataremos este tipo de compuestos en un apartado específico de este capítulo introductorio.

3.2. FARMACOLOGÍA ANTIGLAUCOMATOSA

Como se ha explicado anteriormente, aunque el glaucoma no siempre se asocia a hipertensión ocular, en la práctica clínica éste es el único parámetro sobre el que podemos actuar con objeto de prevenir el avance de la enfermedad.

En la actualidad, son muchos los fármacos antiglaucomatosos disponibles. La siguiente tabla recoge las opciones terapéuticas que tenemos a nuestra disposición. Aunque existen algunas más, éstas son la más relevantes en la práctica clínica:

Betabloqueantes	<i>Betaxolol</i> <i>Carteolol</i> <i>Timolol</i>
Agonistas adrenérgicos	<i>Brimonidina</i>
Inhibidores de la anhidrasa carbónica	<i>Brinzolamida</i> <i>Dorzolamida</i> <i>Acetazolamida</i>
Análogos de las prostaglandinas	<i>Bimatoprost</i> <i>Latanoprost</i> <i>Tafluprost</i> <i>Travoprost</i>

Tabla 2: Grupos farmacológicos disponibles en la actualidad para el tratamiento médico de glaucoma.

Como regla general, el tratamiento médico del glaucoma comienza como monoterapia. Si ésta no es efectiva o no es bien tolerada, se puede cambiar a otro fármaco en monoterapia. Pero cuando la monoterapia es insuficiente para alcanzar la PIO objetivo, o hay evidencia de progresión, se puede añadir otro fármaco tópico o una formulación combinada (European Glaucoma Society, 2008).

Se ha observado que la monoterapia no es suficientemente efectiva en la reducción de la PIO hasta un 40-75% de los pacientes glaucomatosos a partir de los dos años de tratamiento (Kass MA, 2002). No se deben de asociar dos fármacos del mismo grupo farmacológico. La trabeculoplastia láser es otra opción disponible que se puede asociar al tratamiento médico (European Glaucoma Society, 2008).

También existen en el mercado productos en forma de combinación fija (Tabla 3). Esto supone la unión en un solo colirio de dos grupos farmacológicos diferentes. De esta forma, se facilita la cumplimentación por parte del paciente, se reduce la cantidad de conservante que entra en contacto con la superficie ocular y se aumenta la potencia del fármaco, al combinar diversos mecanismos de acción (Cheng JW, 2012). Son numerosos los estudios que han demostrado que las combinaciones fijas se asocian a menos efectos adversos oculares (Lichter PR, 2001) (Hutzelmann J, 1998) (Clineschmidt CM, 1998) (Goñi FJ, 2005) (Higginbotham EJ, 2009) (Brandt JD, 2008). En la actualidad, las combinaciones fijas disponibles en el mercado se recogen en la siguiente tabla:

Grupo farmacológico	Principio activo
Alfa agonista+Betabloqueante	<i>Brimonidina/Timolol</i>
Inhibidor de la anhidrasa carbónica+ Alfa agonista +	<i>Brinzolamida/Brimonidina</i>
Inhibidor anhidrasa carbónica + Betabloqueante	<i>Dorzolamida/Timolol</i>
Inhibidor anhidrasa carbónica + Betabloqueante	<i>Brinzolamida/Timolol</i>
Análogo PG+ Betabloqueante	<i>Bimatoprost/Timolol</i>
Análogo PG+ Betabloqueante	<i>Latanoprost/Timolol</i>
Análogo PG+ Betabloqueante	<i>Travoprost/Timolol</i>

Tabla 3. Combinaciones fijas para el tratamiento del glaucoma disponibles en el momento actual.

3.2.1. Betabloqueantes

Son fármacos antagonistas adrenérgicos que reducen la PIO al disminuir la producción de humor acuoso por el cuerpo ciliar. El efecto es máximo a las dos horas y se usan en pautas de dos veces al día. Las formulaciones en forma de gel permiten una administración cada 24 horas. Existen formas sin conservantes y formulaciones combinadas (Tabla 3).

Durante muchos años se han utilizado como monoterapia porque son efectivos, baratos y bien tolerados. Se debe de prestar atención a pacientes con arritmias y problemas broncopulmonares debido a posibles efectos adversos. El más utilizado en la práctica clínica diaria es el *timolol* (Stamper RL, 2002). Se han relacionado con la hipotensión arterial nocturna, lo que podría suponer un mayor riesgos de daño glaucomatoso (Hayreh SS, 1999) (Stamper RL, 2002).

3.2.2 Agonistas adrenérgicos

El más frecuentemente utilizado es la *brimonidina*, un agonista α -2 selectivo que ejerce su acción por dos vías: por una parte, produce un descenso de la PIO al disminuir la producción de humor acuoso; y por otra, aumenta su salida, al actuar sobre el flujo úveo-escleral. Su efecto dura 12 horas (European Glaucoma Society, 2008).

La *brimonidina* se puede asociar en combinación fija, tanto con un betabloqueante como más recientemente con un inhibidor de la anhidrasa carbónica.

3.2.3 Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Ejercen su acción hipotensora mediante la reducción de producción de humor acuoso. Están disponibles en forma de colirio como la *brinzolamida* 1% y la *dorzolamida* 2% o de forma oral como la *acetazolamida*. Las formas tópicas tienen una posología de 2 ó 3 veces al día. La *acetazolamida* por vía oral solo se usa en casos en que no es posible el tratamiento tópico o éste no es efectivo, pues es un fármaco con numerosos efectos secundarios (Lippa EA, 1996).

Tanto la *brinzolamida* como la *dorzolamida* se encuentran en el mercado asociadas a *timolol* en forma de combinación fija y, recientemente, ya está disponible una combinación de *brinzolamida* con *brimonidina* (alfa agonista) (Greig SL, 2015).

3.2.4. Análogos de las prostaglandinas

Actualmente, los análogos de prostaglandinas son considerados como la primera línea de tratamiento médico, debido al menor número de instilaciones requerido al día (tan sólo una, habitualmente por la tarde o noche), buena tolerabilidad con escasos efectos secundarios sistémicos y su probada eficacia hipotensora (Denis P, 2007) (Bean GW, 2008) (Aptel F, 2008) (Konstas AG, 2013) (Swymer C, 2012). De todos estos fármacos, solo el *bimatoprost* es, además, análogo de las prostamidas (Woodward DF, 2013) (Martínez A, 2008).

Los análogos de prostaglandinas producen un aumento del flujo úveo-escleral, reduciendo la PIO en un 20-35%. La reducción de la PIO comienza a las 2-4 horas de la primera administración y su pico se alcanza a las 8-12 horas. El efecto es máximo a las 3-5 semanas del inicio del tratamiento (Tabla 4) (European Glaucoma Society, 2008).

Efecto hipotensor ocular
<i>Bimatoprost</i> 7-8 mmHg (basal 26mmHg)
<i>Latanoprost</i> 6-8 mmHg (basal 24-25mmHg)
<i>Tafluprost</i> 5-8mmHg (basal 25-27mmHg)
<i>Travoprost</i> 7-8mmH (basal 25-27mmHg)

Tabla 4. Eficacia hipotensora de los análogos de prostaglandinas (European Glaucoma Society, 2008)

Los análogos de las prostaglandinas pueden usarse asociados a otros hipotensores e incluso existen combinaciones fijas en el mercado con *timolol*. Estas combinaciones, también han demostrado ser tan eficaces como cada uno de los compuesto por separado como monoterapia (Tabet R, 2008) (Aptel F, 2012).

3.3. CONSERVANTES EN COLIRIOS OFTALMOLÓGICOS

La mayoría de los medicamentos de uso ocular requieren de algún tipo de conservante para mantener sus propiedades farmacológicas y terapéuticas desde que se sintetizan hasta que llegan al enfermo y ejercen la función para la que han sido diseñados. Sin embargo, algunos estudios sugieren que estos conservantes podrían presentar ciertos efectos citotóxicos sobre la superficie ocular (Baudouin C, 2010).

Un porcentaje muy importante de los colirios actualmente utilizados se presentan farmacológicamente en envase multidosis. En Estados Unidos, la FDA (*Food and Drugs Administration*) obliga a que todos ellos contenga algún conservante para inhibir el crecimiento microbiano y evitar la biodegradación (FDA, 2008). Por ejemplo, se ha documentado que los envases de lágrimas artificiales sin conservantes tienen alto riesgo de contaminación a las 10 horas de su apertura y tras múltiples instilaciones (Kim MS, 2008).

El excipiente más ampliamente utilizado en la elaboración de colirios en oftalmología es el *cloruro de benzalconio* (BAK), muy eficaz en sus funciones antimicrobianas, que posee un perfil de seguridad adecuado (Baudouin C, 2010).

El uso continuado de colirios es necesario en el tratamiento de enfermedades como el ojo seco y el glaucoma. Este hábito repetitivo conduce a la aparición de irritación ocular, sequedad, pérdida de células epiteliales, junto a otros efectos indeseados. Estos daños podrían estar producidos tanto por los principios activos como por los conservantes que se usan en su formulación (Baudouin C, 1999).

Los conservantes oftalmológicos se pueden clasificar en tres grupos (Freeman PD, 2009):

- **Conservantes detergentes tensioactivos:** Producen la muerte de organismos procariotas al alterar su membrana lipídica, por lo que el contenido del interior de microorganismo sale hacia fuera por la inestabilidad de la membrana. Las células de los mamíferos no pueden neutralizar este tipo de conservantes, por lo que éste se podría incorporar en la célula y dar lugar a un efecto tóxico. Ejemplos de este tipo son el BAK y el cetrimonio (Álvarez de Toledo J, 2011)
- **Conservantes oxidativos:** Son generalmente moléculas más pequeñas que producen una alteración de la membrana lipídica pero de forma diferente a los detergentes, ya que penetran la membrana alterando el ADN, las proteínas y los lípidos. Este tipo de conservantes son considerados como de segunda generación y se han desarrollado para intentar minimizar los efectos secundarios de los conservantes tensioactivos, que son reconocidos como más agresivos. Al utilizarse a concentraciones más bajas, los conservantes oxidativos suelen asociarse a menores efectos secundarios (Noecker RJ, 2004). Además, resultan menos tóxicos para las células de los mamíferos, las cuales están equipadas con enzimas capaces

de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (Álvarez de Toledo J, 2011).

- **Conservantes almacenadores de iones:** son el tipo más recientemente desarrollado. Su acción es similar a los oxidativos. Un ejemplo de esta clase de conservantes es el SofZia™. Sus componentes se inactivan en contacto con los cationes que están presentes de forma normal en la película lagrimal (Kahook MY, 2007).

Debido a su importancia y a que tres de los cuatro compuestos analizados en esta Tesis Doctoral presentan BAK en su formulación comercial, trataremos este conservante con mayor profundidad en el siguiente apartado.

3.3.1. Cloruro de benzalconio

El BAK es una sal de amonio cuaternario y su fórmula condensada es *n*-alquil-metil-bencil-cloruro de amonio (Figura 9). Es un compuesto bipolar muy hidrosoluble y con propiedades surfactantes. Actúa como desinfectante, bactericida e inhibidor de la actividad viral (Álvarez de Toledo Elizalde J, 2011). En la actualidad, el BAK está presente en muchos productos de la vida diaria: geles de afeitar, lociones para después del afeitado, cosméticos, sprays nasales, detergentes, suavizantes, jabones de manos y caras, toallitas higiénicas, tratamientos de quemaduras y úlceras, desinfectantes de productos quirúrgicos, desinfectantes prequirúrgicos de piel, cremas espermicidas, desodorantes y productos para el cabello entre otros.

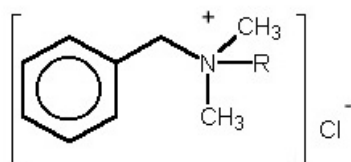


Figura 9: Fórmula química de BAK

El BAK ejerce su acción mediante diferentes vías (Álvarez de Toledo Elizalde J, 2011):

- Desnaturalizando las proteínas celulares esenciales, cambiando su estructura bioquímica.
- Inactivando las enzimas productoras de energía con el consiguiente desajuste metabólico.
- Rompiendo la membrana celular.

Su efecto es rápido y mayor a la temperatura de 37° en medio alcalino. Su espectro de acción son sobre todo bacterias Gram-positivas, aunque, cuando se combina con EDTA, es efectivo contra gérmenes Gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, también tiene actividad antifúngica, particularmente contra *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* y espermicida (Charnock C, 2006). Las esporas bacterianas, en cambio, son resistentes a su exposición.

Los efectos citotóxicos del BAK han sido previamente demostrados tanto en estudios realizados en animales de experimentación como en líneas celulares humanas e incluso en pacientes tratados por glaucoma (Álvarez de Toledo J, 2011).

A este respecto, diversos estudios realizados sobre animales de experimentación encontraron que se producía un daño corneal y conjuntival proporcional a la concentración de BAK (Noecker RJ, 2004). El uso de BAK se asociaba a fibrosis crónica en la conjuntiva (Mietz H, 1994) (Mietz H, 1997) y a una reacción inflamatoria con infiltración de células inmunocompetentes en el limbo y la conjuntiva bulbar de ratas (Becquet F, 1998). Asimismo, el uso de fármacos oculares con BAK al 0,01% producía queratopatía superficial que podía llegar hasta el 9% de la superficie corneal (Furrer P, 2001). Otros estudios han comparado el daño producido en ratones de diferentes análogos de prostaglandinas, observando que las formulaciones sin BAK se asociaron a menor inflamación, apoptosis y daño corneal (Kim JH, 2015) (Barabino S,

2014) (Uematsu M, 2015). Además, diversos trabajos señalan que el BAK produce una disminución del tiempo de ruptura lagrimal hasta en cuatro veces (Wilson WS, 1975) (Pisella PJ, 2000), lo que implica una mayor sequedad, disconfort y daño corneal así como un aumento de expresión de marcadores citotóxicos inflamatorios (Baudouin C, 2001).

Por otro lado, estudios en líneas celulares humanas demostraron el daño que producen los conservantes de los colirios oftálmicos. En las células conjuntivales humanas de la línea *Wong-Kilbourne* de la conjuntiva, la exposición a concentraciones de 0.1% y 0.5% de BAK causó lisis celular. En concentraciones inferiores, también se observó toxicidad: al 0.01% se produjo muerte celular en 24 horas e incluso concentraciones de 0.005-0,0001% se observó apoptosis en 24-72 horas. Cuanto mayor era la concentración del BAK, mayor era tasa de muerte celular (De Saint Jean MB, 1999) (De Saint Jean MC, 2004). El trabajo de Ayaki analizó diferentes colirios con y sin conservantes y encontró que el segundo grupo fue menos citotóxico para células humanas endoteliales, epiteliales y conjuntivales (Ayaki M, 2008). Otro estudio sobre la misma línea *Wong-Kilbourne*, sugiere que el propio conservante causa el daño, y que el conservante a solas, es incluso más dañino que cuando se asocia a fármacos (Pisella PJ, 2002). En otro estudio sobre fibroblastos conjuntivales humanos, se observó una relación dosis-dependiente entre el BAK y la citotoxicidad (Kim EJ, 2013).

Finalmente, los estudios realizados en pacientes sometidos a tratamiento con colirios hipotensores que contenían conservantes demostraron que el uso de estos fármacos se asociaba a mayores complicaciones. El empleo de estos colirios se asocia a una mayor cicatrización y cierre de la fístula. Broadway y colaboradores estudiaron mediante biopsias intraoperatorias la conjuntiva de 124 pacientes sometidos a trabeculectomía y encontraron que existía una inflamación conjuntival subclínica con aumento de macrófagos y linfocitos en el epitelio; fibroblastos y macrófagos en la sustancia propia superficial; y macrófagos y linfocitos en la sustancia propia profunda.

Esta inflamación era tanto mayor como el número de colirios usados y duración del tratamiento (Broadway DC, 1994b). Lavin comparó dos grupos de pacientes: uno en que se realizó trabeculectomía primaria; y un segundo grupo que se sometió a la misma cirugía pero que había estado recibiendo terapia hipotensora médica durante más de un año, encontrando mejores resultados en los que no había tenido tratamiento previo (Lavin MJ, 1990). Por tanto el tratamiento médico crónico induce inflamación de la conjuntiva a expensas de los fibroblastos lo que supone un factor de riesgo al fracaso de la cirugía filtrante de glaucoma (Broadway DC, 2001).

4. Viabilidad celular

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es determinar el daño que producen los colirios de análogos de prostaglandinas sobre cultivos de células conjuntivales humanas. Para ello, se estudiaron parámetros de viabilidad celular y citotoxicidad.

Tanto la viabilidad celular como la citotoxicidad son cuantificables y disponemos de diferentes pruebas o ensayos para determinarlas. Entre ellas, podemos citar la evaluación de la integridad de la membrana celular, ensayos funcionales, ensayos de viabilidad a través de biosensores de fluorescencia, ensayos morfológicos, microanálisis por energía dispersiva de rayos X y técnicas de determinación de la expresión genética mediante *microarrays*. Por su importancia, destacamos los ensayos funcionales y los métodos que se basan en la evaluación de la integridad de la membrana celular.

4.1. ENSAYOS FUNCIONALES

Estos ensayos se basan en estudiar el funcionamiento metabólico de la célula mediante diferentes métodos, y nos dan una idea muy fiable del estado metabólico de la célula y, por tanto, de su viabilidad a nivel funcional. Para su estudio, se pueden aplicar diversas técnicas:

Técnica del sodio 5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio (WST-1) Este método permite analizar de forma directa la viabilidad celular y, de manera indirecta, la proliferación celular, por lo que se trata de una técnica de utilidad doble. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la transformación de las sales de tetrazolio en cristales de formazán solubles en agua, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales que se producen de forma natural cuando las células son

viables (Martin-Piedra MA, 2014) (Tsukatani T, 2015) (Ayaki M, 2008). Por tanto, su presencia es directamente proporcional al número de células funcionalmente activas y en estado de proliferación.

Técnica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este ensayo se basa en el análisis de la función bioenzimática de proteínas involucradas en la producción de ATP y por tanto en la generación de energía. Este compuesto de color amarillento, se torna en morado al reducirse cuando se transforma por acción de enzimas mitocondriales de las células vivas y metabólicamente activas. La adición de MTT al medio de cultivo y su posterior cuantificación colorimétrica nos informa del número de células metabólicamente viables (Mosmann T, 1983) (Sumantran VN, 2011) (Oliveira AC, 2014) (Smedowski, 2014).

Evaluación de la funcionalidad enzimática citoplasmática. Una de las técnicas más utilizadas para medir la actividad de las enzimas del citoplasma es la utilización del compuesto calceína-AM. La calceína-AM es metabolizada por las esterasas citosólicas de la célula viva, dando lugar a una tinción verde fluorescente que permite identificar únicamente a las células metabólicamente activas. En numerosas ocasiones, este compuesto se utiliza combinado con homodímeros de etidio (técnica LIVE/DEAD).

Otros ensayos funcionales. Con menor frecuencia, el estado funcional celular se puede determinar mediante técnicas fluorescentes, tasa de ADN con tritio radioactivo o determinación de la síntesis proteica.

4.2. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR

La membrana celular se altera en una célula en las últimas fases del proceso de muerte celular, por lo que su ruptura es indicativa de un proceso irreversible de citotoxicidad. Para la determinación de la integridad de la membrana existen diversos métodos basados en la exclusión o inclusión de colorantes o sustancias fluorescentes, siendo más frecuentemente utilizados los ensayos de exclusión de colorantes vitales como el azul tripán o los derivados de homodímeros de etidio que tiñen los núcleos de las células muertas de color rojo fluorescente. En ambos casos, la célula que presenta una membrana íntegra y funcional es capaz de excluir los colorantes, con lo que únicamente la célula muerta se observa teñida con estos colorantes.

En la presente Tesis Doctoral hemos utilizado homodímeros de etidio combinados con calceína-AM (técnica LIVE/DEAD), lo cual nos permitió realizar una evaluación más completa de la viabilidad celular (Martin-Piedra MA, 2014) (Oliveira AC, 2014).

4.3. OTROS ENSAYOS

Para la determinación de la viabilidad celular mediante otros métodos, se han descrito numerosas técnicas basadas en el análisis del potencial de membrana celular (Ehrenberg B, 1988), la liberación de sustancias intracelulares como el ADN o el LDH (Legrand C, 1992) (Smedowski A, 2014), biosensores (Giuliano KA, 1998) (Vinay M, 2015) (Senutovitch N, 2015), ensayos morfológicos (Debbage P, 1985) y microanálisis por energía dispersiva de rayos X (Alaminos M, 2007) (Vico M, 2015).

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es evaluar el efecto que producen los cuatro análogos de prostaglandinas más utilizados en clínica del glaucoma sobre cultivos primarios de células conjuntivales humanas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer cultivos celulares primarios de células estromales conjuntivales humanas a partir de muestras de biopsias operatorias.
2. Evaluar los efectos citotóxicos de los colirios de análogos de prostaglandinas (*bimatoprost*, *latanoprost*, *tafluprost* y *travoprost*) sobre los cultivos primarios de células conjuntivales utilizando ensayos metabólicos basados en la detección colorimétrica con sales de tetrazolio (WST-1) a distintas concentraciones y a distintos tiempos de exposición.
3. Evaluar los efectos citotóxicos de los colirios de análogos de prostaglandinas (*bimatoprost*, *latanoprost*, *tafluprost* y *travoprost*) sobre los cultivos primarios de células conjuntivales utilizando ensayos metabólicos basados en MTT a distintas concentraciones y a distintos tiempos de exposición.
4. Evaluar los efectos citotóxicos de los colirios de análogos de prostaglandinas (*bimatoprost*, *latanoprost*, *tafluprost* y *travoprost*) sobre los cultivos primarios de células conjuntivales utilizando ensayos metabólicos basados en ensayos mixtos metabólicos y de exclusión de colorantes vitales LIVE/DEAD a distintas concentraciones y a distintos tiempos de exposición.
5. Seleccionar los análogos de prostaglandinas que demuestren mayor bioseguridad para su utilización sobre la superficie ocular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE BIOPSIAS CONJUNTIVALES

Las células utilizadas en este estudio han sido obtenidas, previo consentimiento por parte del donante, de biopsias operatorias de pacientes que se sometían a cirugía de estrabismo o de desprendimiento de retina. Para este tipo de intervenciones, se requirió cortar y separar la conjuntiva (peritomía) para tener acceso a los músculos extraoculares, por lo que se pudieron obtener pequeñas biopsias conjuntivales de forma fácil, segura y sin detrimento para el paciente.

Se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes sanos sin ninguna enfermedad de la superficie ocular.
- Pacientes que no hubieran usado colirios previamente de forma crónica.

Las muestras fueron obtenidas en quirófano con el máximo grado de asepsia. Se recogieron fragmentos conjuntivales de pequeño tamaño (1-2mm) libres de tejido subconjuntival o cápsula de Tenon, las cuales se conservaron en suero fisiológico hasta el momento de su procesamiento en laboratorio.

2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ESTROMALES CONJUNTIVALES

El primer paso consistió en lavar y liberar las células mediante digestión enzimática con colagenasa tipo I de *Clostridium hystolicum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) a una concentración de 2mg/ml y durante 6-8 horas a 37°C con la finalidad de digerir completamente el colágeno de la matriz extracelular. Transcurrido este tiempo, las células fueron centrifugadas a 1.000 revoluciones por minuto (rpm), de tal forma que quedaron agrupadas en un *pellet* bajo un sobrenadante que fue descartado para posteriormente resuspender las células en 5 ml de medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dubecco) (Sigma-Aldrich ref. D5796, Saint-Quentin-Fallavier, Francia) suplementado con suero bovino fetal al 10% y

antibióticos-antimicóticos al 1% (Sigma-Aldrich), en frascos de cultivo celular.

Las células en cultivo se mantuvieron en incubador a 37°C con un 5% de CO₂ utilizando el mismo medio de cultivo, el cual fue reemplazado cada 3 días para favorecer la renovación de nutrientes y la eliminación de residuos celulares.

3. SUBCULTIVOS CELULARES

A medida que las células conjuntivales humanas fueron proliferando en los frascos de cultivo iniciales, se hizo necesario su traslado a otros de mayor tamaño para aumentar el número de células disponibles e impedir la inhibición celular por contacto. Para realizar el subcultivo, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con una solución salina tamponada PBS (*Phosphate Buffered Solution*). Posteriormente, se añadieron 2,5 ml de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y se dejó actuar a 37°C durante 3 minutos para despegar las células del frasco de cultivo. Con objeto de inactivar la tripsina, se añadió medio de cultivo con suero bovino fetal. Posteriormente, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos y se obtuvo *pellet* con un sobrenadante que se eliminó. Se añadieron 10 ml de medio de cultivo y se resuspendieron las células en frascos de cultivo de mayores dimensiones.

4. GRUPOS DE ESTUDIO

Las presentaciones comerciales de colirios de prostaglandinas utilizadas en estas Tesis Doctoral, fueron las siguientes (Tabla 5):

- **Bimatoprost 0,03%** con una concentración de BAK de 0.005% (Lumigan 0,3[®], Allergan, Irvine, CA).

- **Latanoprost 0,005%** con una concentración de BAK de 0.02% (Xalatan[®], Pfizer, Nueva York, NY).
- **Tafluprost 0,0015%** que no tiene conservantes (Saflutan[®] Merck, Kenilworth, NJ)
- **Travoprost 0,004%** con una concentración de BAK de 0,015% (Travatan[®], Alcon Laboratories Fort Worth, TX).

Prostaglandina	Principio activo	Conservante
<i>Bimatoprost</i>	0,03%	0,005% BAK
<i>Latanoprost</i>	0,005%	0.02% BAK
<i>Tafluprost</i>	0,0015%	Sin BAK
<i>Travoprost</i>	0,004%	0,015% BAK

Tabla 5. Formulaciones comerciales de análogos de prostaglandinas utilizadas en esta Tesis Doctoral.

A su vez, cada fármaco fue analizado a distintas concentraciones (100%, 50%, 25%, 5%, 1% y 0,1%) en medio de cultivo, evaluándose los resultados a distintos tiempos (5 min, 30 min, 1h, 6h y 24h).

Como control positivo de muerte celular, las células fueron tratadas con tritón X-100 al 1%. Este detergente es capaz de producir la muerte del 100% de las células, de acuerdo con estudios previos (Oliveira AC, 2014). Como control negativo (células viables), se utilizó medio de cultivo sin ningún fármaco añadido.

5. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE WST-1

En primer lugar, la viabilidad celular se analizó mediante el ensayo enzimático WST-1 (sodio 5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio). Para ello, fue necesaria la utilización de una placa de 96 pocillos, sobre la que se cultivó durante 24 horas una densidad celular de aproximadamente 10.000 células por pocillo. Tras ello, se añadieron 100µl de solución de cada fármaco (*bimatoprost*, *latanoprost*, *tafluprost* y *travoprost*) en sus diferentes concentraciones (100%, 50%, 25%, 5%, 1% y 0,1%) para posteriormente ser incubados un tiempo predeterminado (5 min, 30 min, 1h, 6h y 24h). Transcurrido ese tiempo, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100µl de medio de cultivo y 10µl del reactivo *cell proliferation reagent WST-1* (Roche Diagnostics; Indianapolis IN). Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 4 horas en una atmósfera de 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido ese tiempo, se leyó en un espectrofotómetro a longitud de onda de 420nm habiéndolo agitado antes durante un minuto (Figura 10).



Figura 10. Análisis de una placa de 96 pocillos en la que se realizó ensayo colorimétrico de WST-1.

6. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT

En segundo lugar se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo enzimático MTT (*bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*). De igual forma que en los ensayos de WST-1 previamente descritos, para desarrollar esta técnica se requirieron aproximadamente 10.000 células conjuntivales subcultivadas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tras ello, en cada pocillo fue necesario añadir 100µl de la solución de cada fármaco (*bimatoprost, latanoprost, tafluprost y travoprost*) diluida a las diferentes concentraciones (100%, 50%, 25%, 5%, 1% y 0,1%). Transcurrido el tiempo predeterminado (5 min, 30 min, 1h, 6h y 24h), se procedió a la retirada del sobrenadante y al lavado de las células con PBS en cada uno de los pocillos. Posteriormente, se agregaron 100µl de medio de cultivo y 10µl del reactivo *MTT labeling agent* y se incubó la mezcla durante 4 horas a 37°C para dar lugar a la formación de cristales de formazán por parte de las células viables. Una vez realizado este paso, se añadieron 100µl de la *solución de solubilización* en cada pocillo y se incubó la placa durante 12 horas hasta la dilución de los cristales de formazán.

Por último, se cuantificó la absorbancia espectrofotométrica de cada pocillo mediante un lector de placas a una longitud de onda de 550 y 560nm (Figura 11).

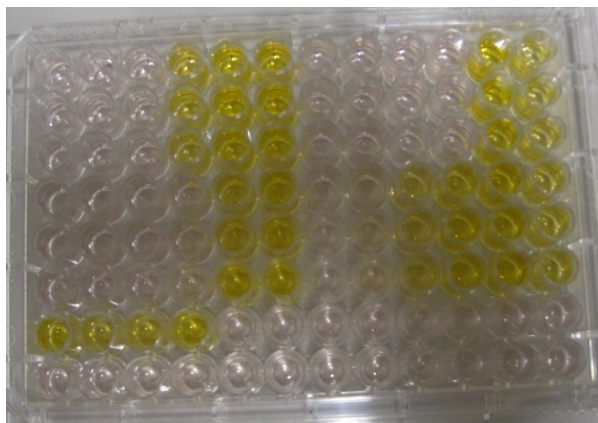


Figura 11. Análisis de una placa de 96 pocillos en la que se realizó ensayo colorimétrico de MTT.

7. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE LIVE/DEAD

Mediante esta técnica, determinamos viabilidad celular utilizando un método de fluorescencia bicolor que permite detectar el nivel intracelular de acetoximetil-calceína y homodímeros de etidio.

Para realizar este ensayo, se cultivaron 20.000 células en portaobjetos dotados de cámara de cultivo celular (Lab-Tek Chamber Slides, Nunc, Roskilde, Denmark) durante 24 horas para permitir su adhesión. Luego, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 500µl de cada dilución de análogo de prostaglandina (*bimatoprost*, *latanoprost*, *tafluprost* y *travoprost*) durante cada tiempo de incubación determinado. Tras ello, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con PBS. Después, se añadieron los reactivos del LIVE/DEAD® (acetoximetil-calceína y homodímeros de etidio) (Invitrogen, Carlsbad, CA) según los protocolos de fabricante. A continuación, se lavan las células con PBS y se analizan en un microscopio óptico de fluorescencia, determinándose el porcentaje de células vivas y muertas en cada caso (Figura 12):

- **Células vivas:** mediante la acción enzimática de las esterasas intracelulares, estas células son capaces de convertir la acetoximetil-calceína en un colorante verde intensamente fluorescente dentro del citoplasma de las células vivas.
- **Células muertas:** la generación de roturas y poros en la membrana celular permite la entrada de homodímeros de etidio, los cuales se unen a los ácidos nucleicos, produciendo un brillo rojo intenso dentro de los núcleos de las células muertas.

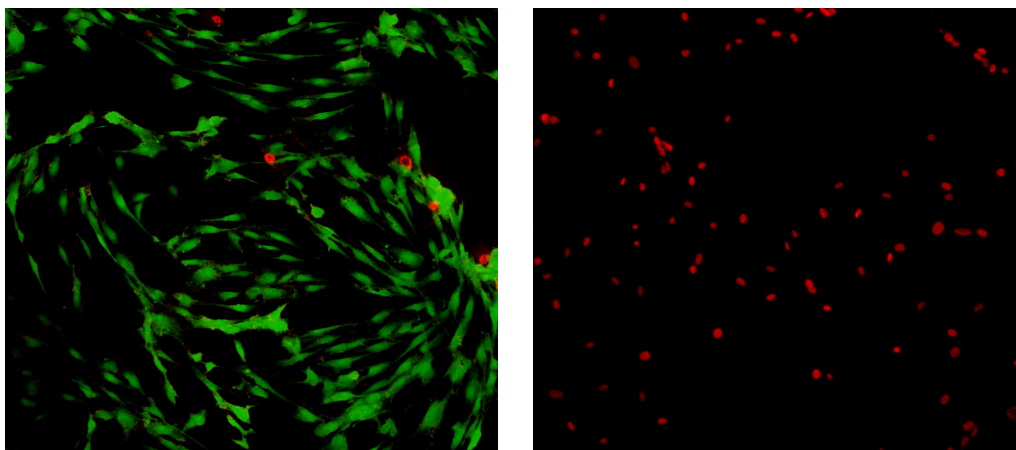


Figura 12: Análisis de viabilidad celular mediante la técnica LIVE/DEAD en un cultivo celular viable (izquierda) y en células muertas (derecha). Las células vivas muestran el citoplasma de color verde mientras que las muertas presentan el núcleo de color rojo.

Para cada tiempo y concentración estudiada se obtuvieron tres fotografías de diferentes campos de la preparación. Para el conteo de células vivas y muertas se utilizó el software **ImageJ** v1-15, programa público y libre de procesamiento de imágenes basado en Java desarrollado por el *National Institutes of Health* de Estados Unidos (<http://imagej.nih.gov/ij>)

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se normalizaron los datos de viabilidad obtenidos para cada grupo de estudio y para cada técnica respecto a los controles negativo (100% de viabilidad celular) y positivo (0% de viabilidad celular), con lo que en cada grupo se calculó el porcentaje de viabilidad celular respecto a ambos controles.

En segundo lugar, para cada técnica se compararon los resultados obtenidos en dos grupos de estudio distintos, mediante un análisis de comparaciones por pares con la prueba estadística de Wilcoxon. En concreto,

para cada tiempo se compararon los resultados obtenidos para cada fármaco con el resto de los fármacos y con los controles positivo y negativo para determinar la influencia de cada análogo de prostaglandina sobre la viabilidad celular.

Para determinar el efecto de la concentración de cada fármaco sobre la viabilidad celular, para cada colirio de análogo prostaglandinas se calculó la concentración que reducía la función celular al 50%, obteniéndose la dosis letal 50 (DL50).

Asimismo, se realizaron análisis de correlación *tau* de Kendall para determinar la relación estadística existente entre los siguientes grupos de estudio:

- La viabilidad celular y el tiempo de incubación.
- La viabilidad celular y la concentración de fármaco.
- Los resultados obtenidos para los diferentes métodos (MTT, WST-1 y LIVE/DEAD).

En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativos los valores de *p* inferiores a 0,05 para las pruebas de doble cola. Se utilizó el software SPSS v. 16.00 para todos los análisis estadísticos.

RESULTADOS

1. Generación de cultivos celulares primarios de células estromales conjuntivales humanas

Para realizar los diferentes ensayos de viabilidad celular llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, en primer lugar se procedió a aislar y cultivar las células conjuntivales humanas a partir de biopsias. En general, el tratamiento de las muestras mediante digestión enzimática logró aislar de forma eficiente las células estromales conjuntivales, las cuales fueron cultivadas en medios específicos en condiciones estándar de cultivo a 37°C con un 5% de CO₂.

Como se puede apreciar en la Figura 13 las células en cultivo mostraron morfología fusiforme o estrellada, típica de células estromales, alcanzando confluencia alrededor del día 24 de cultivo (24±3 días de media). Conforme las células se van acercando a la confluencia, los espacios intercelulares van disminuyendo, quedando las células compactadas con una morfología más fusiforme que estrellada (Figura 13).

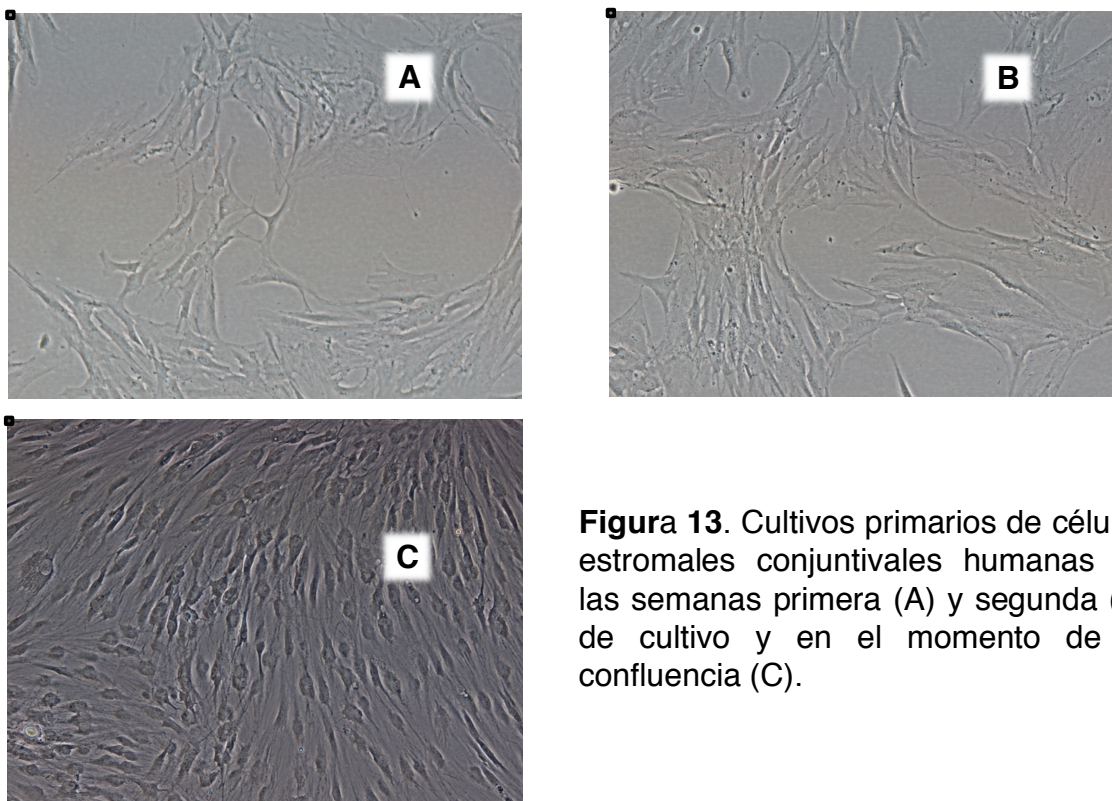


Figura 13. Cultivos primarios de células estromales conjuntivales humanas en las semanas primera (A) y segunda (B) de cultivo y en el momento de la confluencia (C).

2. Determinación de la viabilidad celular mediante WST-1

El análisis de citotoxicidad de los distintos fármacos sobre las células conjuntivales humanas utilizando la técnica WST-1 mostró que los cuatro análogos de prostaglandinas tenían algún grado de toxicidad.

En primer lugar, se observó que las células correspondientes a los controles negativos (cultivadas en medio de cultivo sin fármaco) presentaban los mayores índices de viabilidad, mientras que los controles positivos (células incubadas en Tritón X-100) mostraron valores cercanos a cero para la prueba WST-1. En segundo lugar, se observó que los valores obtenidos para las células incubadas en presencia de algún análogo de prostaglandinas se situaban entre el control positivo y el control negativo.

En lo que respecta a la influencia del tiempo de incubación sobre la viabilidad celular, se observó que cada uno de los compuestos estudiados presentaba diferencias estadísticamente significativas con el control positivo de células tratadas con Tritón X-100, siendo los resultados obtenidos para el control positivo significativamente inferiores a los del resto de los grupos (Tabla 6 y Figura 14). Sin embargo, se observó que las diferencias frente al control negativo (células en medio de cultivo sin ningún fármaco) se limitaban a ciertos compuestos y a tiempos específicos. En concreto, como se aprecia en la Tabla 6, las células cultivadas en *bimatoprost* mostraron diferencias significativas con el control negativo a los 5' y a las 6h, mientras que las células cultivadas en presencia de *tafluprost* fueron diferentes a estos controles para todos los tiempos, las células con *travoprost* mostraron diferencias a los 5', 6h y 24h y las células incubadas en presencia de *latanoprost* presentaron diferencias con el control negativo únicamente a los 30'.

Cuando se compararon los distintos compuestos entre sí, se encontró que los valores obtenidos en células cultivadas en *latanoprost* fueron significativamente inferiores a los obtenidos para el resto de fármacos para

todos los tiempos excepto a las 6h, mientras que los niveles de viabilidad obtenidos para *tafluprost* fueron superiores a los del resto de fármacos, excepto para *bimatoprost* a los 5', 1h, 6h y 24h. Finalmente, los datos obtenidos para *travoprost* se diferenciaron muy poco de los resultados obtenidos para *bimatoprost*.

WST-1		<i>Bimatoprost</i>	<i>Tafluprost</i>	<i>Travoprost</i>	<i>Latanoprost</i>	Control Positivo	Control Negativo
5 min	<i>Bimatoprost</i>	-	0,120	0,604	0,000*	0,002*	0,033*
	<i>Tafluprost</i>	0,120	-	0,002*	0,000*	0,006*	0,006*
	<i>Travoprost</i>	0,604	0,002*	-	0,000*	0,002*	0,004*
	<i>Latanoprost</i>	0,000*	0,000*	0,000*	-	0,002*	0,937
30 min	<i>Bimatoprost</i>	-	0,000*	0,460	0,000*	0,000*	0,219
	<i>Tafluprost</i>	0,000*	-	0,000*	0,037*	0,006*	0,000*
	<i>Travoprost</i>	0,460	0,000*	-	0,002*	0,000*	0,061
	<i>Latanoprost</i>	0,000*	0,037*	0,002*	-	0,000*	0,031*
1h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,683	0,074	0,003*	0,000*	0,535
	<i>Tafluprost</i>	0,683	-	0,029*	0,000*	0,000*	0,000*
	<i>Travoprost</i>	0,074	0,029*	-	0,000*	0,000*	0,623
	<i>Latanoprost</i>	0,003*	0,000*	0,000*	-	0,000*	0,134
6h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,306	0,179	0,737	0,002*	0,002*
	<i>Tafluprost</i>	0,306	-	0,001*	0,000*	0,002*	0,002*
	<i>Travoprost</i>	0,179	0,001*	-	0,900	0,002*	0,002*
	<i>Latanoprost</i>	0,737	0,000*	0,900	-	0,002*	0,388
24h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,318	0,116	0,000*	0,000*	0,157
	<i>Tafluprost</i>	0,318	-	0,012*	0,001*	0,000*	0,003*
	<i>Travoprost</i>	0,116	0,012*	-	0,000*	0,000*	0,016*
	<i>Latanoprost</i>	0,000*	0,001*	0,000*	-	0,000*	0,760

Tabla 6. Valores de significación estadística p para la comparación de los resultados obtenidos con la prueba WST-1 entre los distintos grupos de estudio utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon.

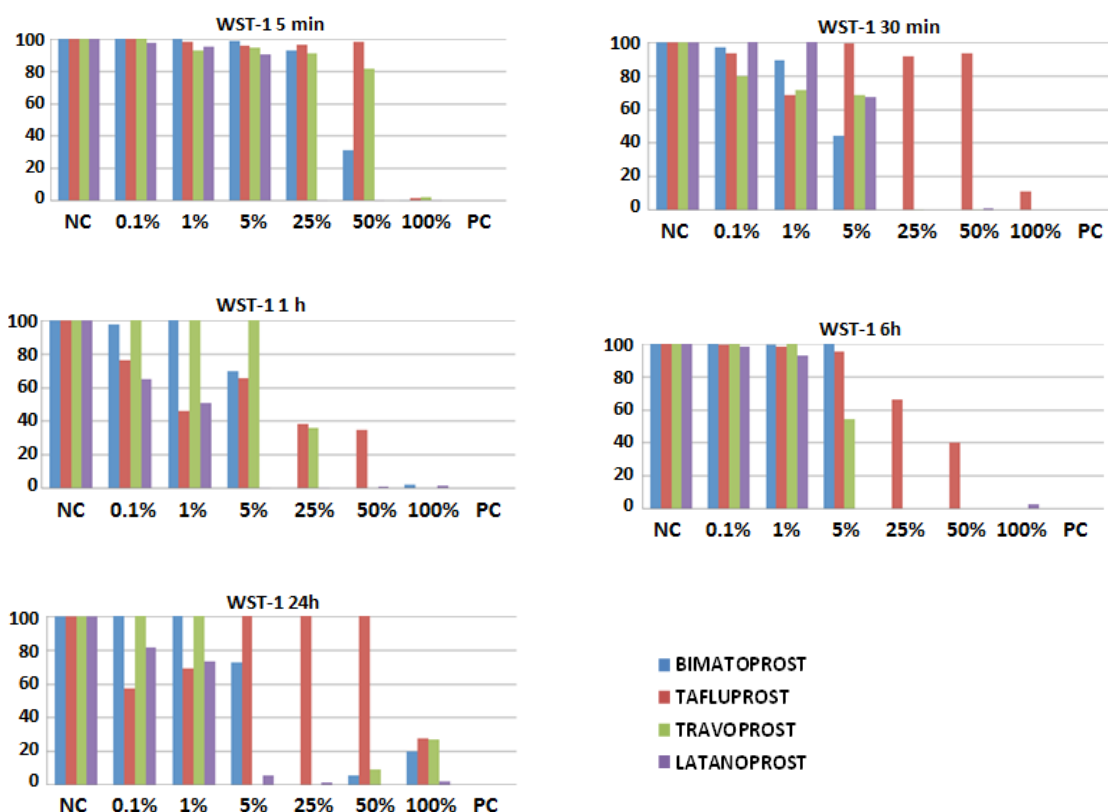


Figura 14. Viabilidad celular determinada mediante WST-1 en células incubadas en concentraciones crecientes de cada análogo de prostaglandinas a los 5 y 30 minutos y tras 1, 6 y 24h. NC: control negativo (células incubadas en medio de cultivo); PC: control positivo (células incubadas en Tritón X-100).

Por otro lado, el análisis estadístico reveló una correlación negativa estadísticamente significativa para la viabilidad celular determinada mediante WST-1 y el tiempo de incubación ($p=0,001$, $r=-0,222$), lo cual confirma que la viabilidad disminuye con el tiempo de incubación en cada uno de los fármacos estudiados.

Para determinar el papel de la concentración del fármaco sobre la viabilidad celular, se calculó la dosis letal 50 (DL50) para cada análogo de prostaglandina (Tabla 7). A este respecto, la DL50 determinada mediante WST-1 reveló que *latanoprost* resultó ser el fármaco más citotóxico, alcanzado con sólo el 8,08% del producto comercial un descenso en la viabilidad celular y en la actividad metabólica del 50%. En contraste, *tafluprost* alcanzó la DL50 con

un 36,77% de concentración del producto comercial y *bimatoprost* y *travoprost* con 16,98% y 17,15%, respectivamente.

DL50	WST-1
<i>Bimatoprost</i>	16,98%
<i>Tafluprost</i>	36,77%
<i>Travoprost</i>	17,15%
<i>Latanoprost</i>	8,08%

Tabla 7. Dosis letal 50 determinada para cada análogo de prostaglandina mediante la técnica WST-1

Asimismo, se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa entre la viabilidad celular determinada mediante WST-1 y la concentración del fármaco ($p=0,000$, $r=-0,470$).

3. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT

Los resultados obtenidos para el ensayo del MTT muestran que la mayoría de los análogos de las prostaglandinas reducen la actividad metabólica mitocondrial.

En primer lugar, las células cultivadas en medio de cultivo sin ningún tipo de fármaco (controles negativos) presentaron los mayores índices de actividad para la prueba MTT, mientras que los controles positivos (células tratadas con Tritón X-100) mostraron muy escasa actividad celular determinada mediante esta técnica. En segundo lugar, se observó que los valores obtenidos para las células incubadas en presencia de algún análogo de prostaglandinas se situaban entre el control positivo y el control negativo.

En lo que respecta a la influencia del tiempo de incubación sobre la viabilidad celular determinada mediante MTT (Tabla 8), se observó que la mayoría de los compuestos estudiados presentaba valores estadísticamente superiores a los obtenidos para el control positivo de células tratadas con Tritón X-100, existiendo algunas excepciones (*latanoprost* 1h y 24h y *bimatoprost* 24h). Respecto al control negativo (células incubadas en medio de cultivo sin otros compuestos añadidos), no encontramos diferencias para *bimatoprost* a los 5' y 30', para *tafluprost* a los 5', 1h y 6h, *travoprost* a los 30' y *latanoprost* a los 30'.

Cuando se compararon los distintos compuestos entre sí para MTT (Figura 15), se encontró que los valores obtenidos en células cultivadas en *tafluprost* fueron significativamente superiores a los obtenidos para el resto de fármacos para todos los tiempos excepto para *bimatoprost* a las 24h, mientras que los niveles de viabilidad obtenidos para *latanoprost* fueron significativamente inferiores a los del resto de fármacos a los 30' y a las 24h y superiores a *travoprost* a las 6h.

Por otro lado, el análisis estadístico reveló que la correlación entre la viabilidad celular determinada mediante MTT y el tiempo de incubación no fue estadísticamente significativa.

MTT		<i>Bimatoprost</i>	<i>Tafluprost</i>	<i>Travoprost</i>	<i>Latanoprost</i>	Control Positivo	Control Negativo
5 min	<i>Bimatoprost</i>	-	0,000*	0,573	0,209	0,003*	0,065
	<i>Tafluprost</i>	0,000*	-	0,000*	0,000*	0,003*	0,117
	<i>Travoprost</i>	0,573	0,000*	-	0,322	0,013*	0,002*
	<i>Latanoprost</i>	0,209	0,000*	0,322	-	0,003*	0,003*
30 min	<i>Bimatoprost</i>	-	0,003*	0,068	0,001*	0,002*	0,592
	<i>Tafluprost</i>	0,003*	-	0,000*	0,000*	0,002*	0,002*
	<i>Travoprost</i>	0,068	0,000*	-	0,001*	0,002*	0,637
	<i>Latanoprost</i>	0,000*	0,000*	0,001*	-	0,002*	0,454
1h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,000*	0,931	0,068	0,002*	0,001*
	<i>Tafluprost</i>	0,000*	-	0,000*	0,008*	0,000*	0,180
	<i>Travoprost</i>	0,931	0,000*	-	0,198	0,003*	0,002*
	<i>Latanoprost</i>	0,068	0,008*	0,198	-	0,486	0,000*
6h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,000*	0,001*	0,122	0,001*	0,001*
	<i>Tafluprost</i>	0,000*	-	0,000*	0,000*	0,005*	0,975
	<i>Travoprost</i>	0,001*	0,000*	-	0,033*	0,001*	0,001*
	<i>Latanoprost</i>	0,122	0,000*	0,033*	-	0,002*	0,001*
24h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,206	0,116	0,000*	0,157	0,000*
	<i>Tafluprost</i>	0,206	-	0,011*	0,000*	0,003*	0,011*
	<i>Travoprost</i>	0,116	0,011*	-	0,000*	0,016*	0,000*
	<i>Latanoprost</i>	0,000*	0,000*	0,000*	-	0,760	0,000*

Tabla 8. Valores de significación estadística p para la comparación de los resultados obtenidos con la prueba MTT entre los distintos grupos de estudio utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon.

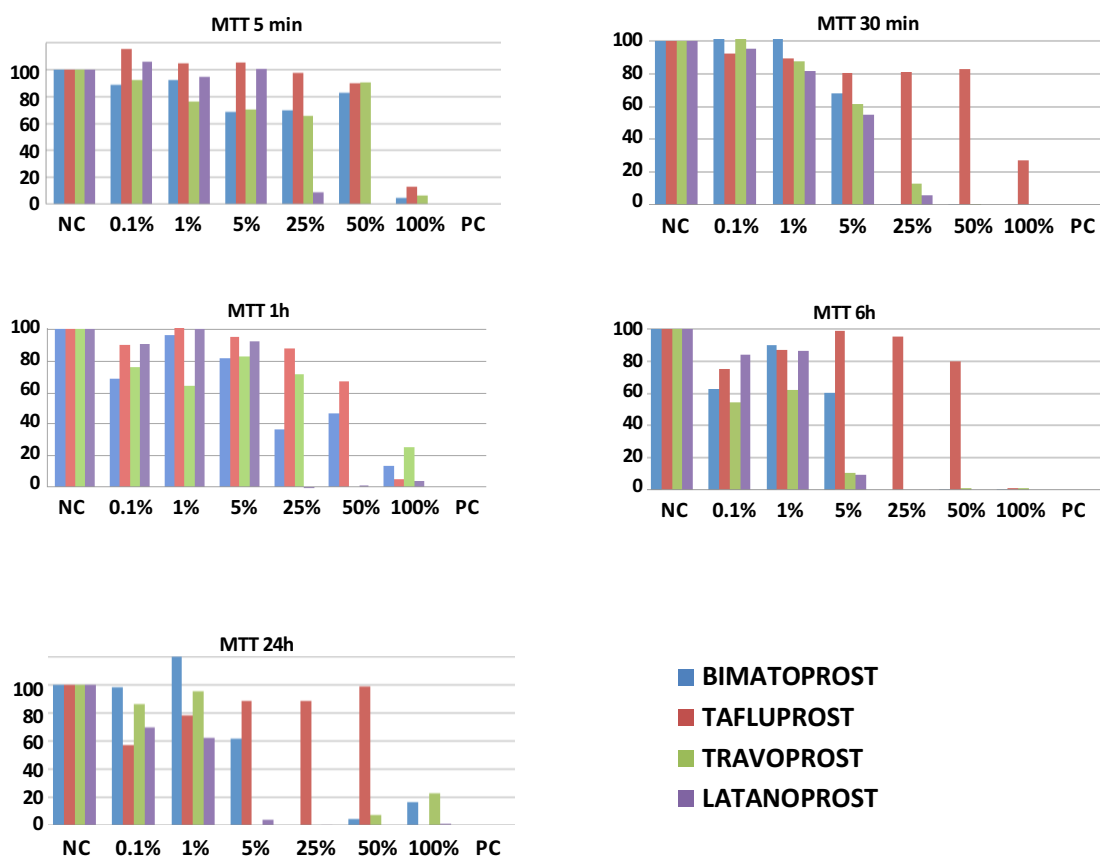


Figura 15. Viabilidad celular determinada mediante MTT en células incubadas en concentraciones crecientes de cada análogo de prostaglandinas a los 5 y 30 minutos y tras 1, 6 y 24h. NC: control negativo (células incubadas en medio de cultivo); PC: control positivo (células incubadas en Tritón X-100).

Los resultados obtenidos al calcular las DL50 para MTT muestran que el fármaco más citotóxico sobre los cultivos celulares conjuntivales humanos fue el *latanoprost*, que con sólo un 8,52% de la concentración de la presentación comercial mostró una reducción de las viabilidad y metabolismo del 50%. El fármaco menos citotóxico fue *tafluprost*, que requería de una concentración de 51,45% para alcanzar la DL50. En una franja intermedia, se situó el *travoprost* con un 14,52% y el *bimatoprost* con 18,36% (Tabla 9).

DL50	MTT
<i>Bimatoprost</i>	18.36%
<i>Tafluprost</i>	51.45%
<i>Travoprost</i>	14.52%
<i>Latanoprost</i>	8.52%

Tabla 9. Dosis letal 50 determinada para cada análogo de prostaglandina mediante la técnica MTT

Finalmente, se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa entre la viabilidad celular determinada mediante MTT y la concentración del fármaco ($p=0,000$, $r=-0,485$).

4. Determinación de la viabilidad celular mediante LIVE/DEAD

Los resultados obtenidos para el ensayo LIVE/DEAD igualmente demostraron que la mayoría de los análogos de las prostaglandinas reducen la viabilidad en las células conjuntivales humanas.

En primer lugar, las células cultivadas en medio de cultivo sin ningún tipo de fármaco (controles negativos) presentaron los mayores índices de actividad para la prueba LIVE/DEAD, mientras que los controles positivos (células tratadas con Tritón X-100) mostraron muy escasa viabilidad celular. En segundo lugar, se observó que los valores obtenidos para las células incubadas en presencia de algún análogo de prostaglandinas se situaban entre el control positivo y el control negativo.

LIVE/DEAD™		<i>Bimatoprost</i>	<i>Tafluprost</i>	<i>Travoprost</i>	<i>Latanoprost</i>	Control Positivo	Control Negativo
5 min	<i>Bimatoprost</i>	-	0,002*	0,028*	0,005*	0,002*	0,002*
	<i>Tafluprost</i>	0,002*	--	0,028*	0,099	0,002*	0,002*
	<i>Travoprost</i>	0,028*	0,028*	-	0,875	0,002*	0,002*
	<i>Latanoprost</i>	0,005*	0,099	0,875	-	0,002*	0,002*
30 min	<i>Bimatoprost</i>	-	0,099	0,331	0,035*	0,002*	0,026*
	<i>Tafluprost</i>	0,099	-	0,049*	0,271	0,002*	0,002*
	<i>Travoprost</i>	0,331	0,049*	-	0,331	0,002*	0,005*
	<i>Latanoprost</i>	0,035*	0,271	0,331	-	0,005*	0,011*
1h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,028*	0,011*	0,506	0,002*	0,011*
	<i>Tafluprost</i>	0,028*	-	0,012*	0,049*	0,002*	0,002*
	<i>Travoprost</i>	0,011*	0,012*	-	0,878	0,002*	0,011*
	<i>Latanoprost</i>	0,506	0,049*	0,878	-	0,002*	0,005*
6h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,099	0,574	0,074	0,002*	0,005*
	<i>Tafluprost</i>	0,099	-	0,157	0,023*	0,002*	0,002*
	<i>Travoprost</i>	0,574	0,157	-	0,011*	0,005*	0,011*
	<i>Latanoprost</i>	0,074	0,023*	0,011*	-	0,002*	0,026*
24h	<i>Bimatoprost</i>	-	0,574	0,026*	0,113	0,002*	0,026*
	<i>Tafluprost</i>	0,574	-	0,021*	0,012*	0,002*	0,005*
	<i>Travoprost</i>	0,026*	0,021*	-	0,916	0,002*	0,026*
	<i>Latanoprost</i>	0,113	0,012*	0,916	-	0,002*	0,026*

Tabla 10. Valores de significación estadística p para la comparación de los resultados obtenidos con la prueba LIVE/DEAD entre los distintos grupos de estudio utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon.

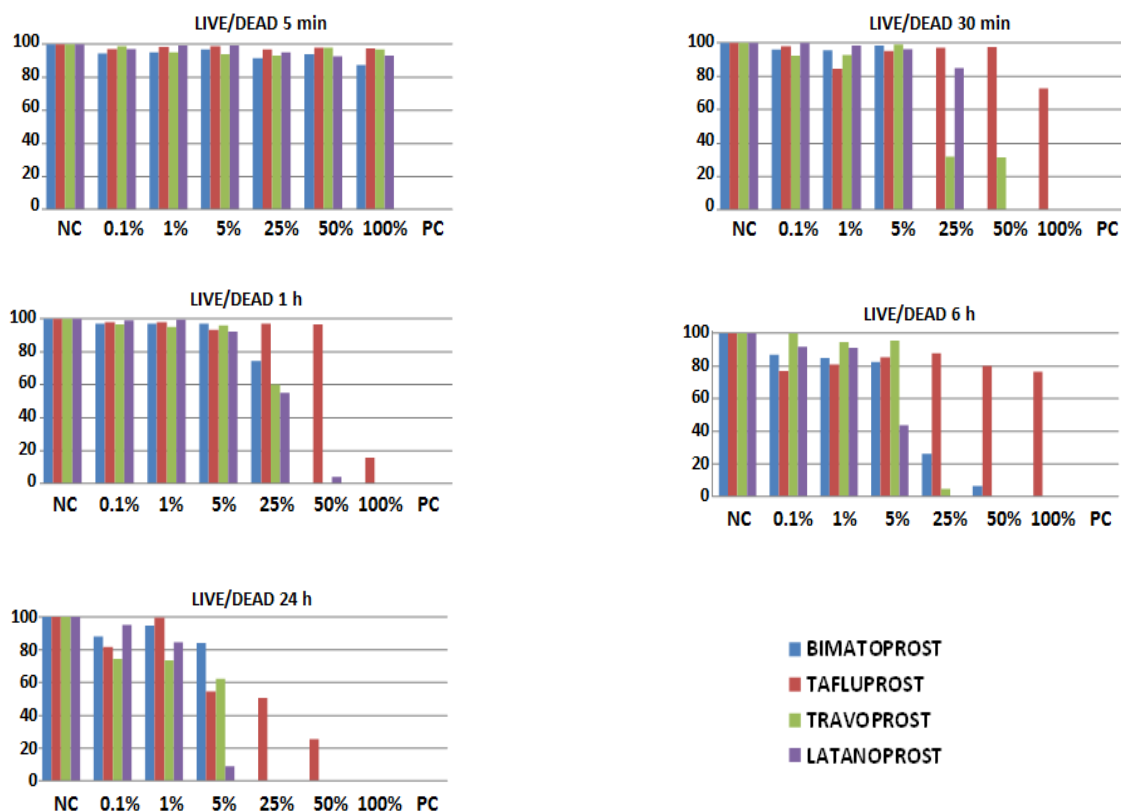


Figura 16. Viabilidad celular determinada mediante LIVE/DEAD en células incubadas en concentraciones crecientes de cada análogo de prostaglandinas a los 5 y 30 minutos y tras 1, 6 y 24h. NC: control negativo (células incubadas en medio de cultivo); PC: control positivo (células incubadas en Tritón X-100).

Cuando se compararon los distintos compuestos entre sí para la viabilidad celular determinada mediante LIVE/DEAD, se encontraron diferencias para compuestos específicos a tiempos de incubación específicos, tal como se muestra en la Tabla 10 y Figura 16. Así, por ejemplo, los valores obtenidos en células cultivadas en *tafluprost* fueron significativamente superiores a los de células tratadas con *travoprost* a todos los tiempos excepto 6h, *latanoprost* a los 1h, 6h y 24h y *bimatoprost* a los 5' y 1h.

Asimismo, el análisis estadístico reveló que la correlación negativa entre la viabilidad celular determinada mediante LIVE/DEAD y el tiempo de incubación fue estadísticamente significativa ($p=0,000$, $r=-0,366$).

Al calcular la DL50 para el ensayo LIVE/DEAD, se observó como *tafluprost* necesitó la más alta concentración para reducir la viabilidad celular al 50%, para lo que se necesita alcanzar un 77,06% de concentración del producto comercial. Al contrario, *latanoprost* resultó ser el más citotóxico, y para alcanzar la DL50, precisa una concentración de 31,36%. Las otras prostaglandinas analizadas, obtuvieron cifras similares. Así, el *bimatoprost* requirió 32,56% y *travoprost* 31,36% (Tabla 11).

DL50	LIVE/DEAD
<i>Bimatoprost</i>	32.56%
<i>Tafluprost</i>	77.06%
<i>Travoprost</i>	32.08%
<i>Latanoprost</i>	31.36%

Tabla 11. Dosis letal 50 determinada para cada análogo de prostaglandina mediante la técnica LIVE/DEAD

Finalmente, se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa entre la viabilidad celular determinada mediante LIVE/DEAD y la concentración del fármaco ($p=0,000$, $r=-0,451$).

4. Análisis de correlación de los valores obtenidos mediante WST-1, MTT y LIVE/DEAD

Cuando se compararon los resultados obtenidos para las tres técnicas utilizadas en esta Tesis Doctoral, se encontró que los resultados tendieron a correlacionarse entre sí de forma altamente significativa.

En concreto, los resultados obtenidos para WST-1 se correlacionaron positivamente con resultados los obtenidos mediante MTT ($p=0,000$, $r=0,551$) y LIVE/DEAD ($p=0,000$, $r=0,512$). Asimismo, los resultados de MTT se correlacionaron positivamente con los obtenidos para WST-1 ($p=0,000$, $r=0,551$) y LIVE/DEAD ($p=0,000$, $r=0,353$), mientras que los de LIVE/DEAD correlacionaron positivamente con los de WST-1 ($p=0,000$, $r=0,512$) y MTT ($p=0,000$, $r=0,353$).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El glaucoma es una enfermedad con una alta prevalencia en la población y uno de los motivos de consulta más frecuentes en la práctica clínica diaria. Las consecuencias que se derivan pueden ser graves, llegando en algunos casos a producir ceguera, con todo lo que ello supone para el paciente y su entorno (European Glaucoma Society, 2008).

Aunque hasta la fecha se han desarrollado numerosas herramientas terapéuticas, los colirios de análogos de prostaglandinas continúan siendo la primera elección para el tratamiento la mayoría de los tipos de glaucoma debido a que son potentes, fáciles de administrar y con efectos secundarios sistémicos reducidos (Schmidl D, 2015). A pesar de su eficacia terapéutica, el hecho de que los pacientes deban utilizar estos fármacos durante prolongados periodos de tiempo obliga a realizar estudios en profundidad que determinen sus niveles de bioseguridad y la ausencia de efectos secundarios que podrían ser acumulativos (Baudouin C, 2010) (Stalmans I, 2013). Por ese motivo, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es evaluar los principales tipos de análogos de prostaglandinas disponibles comercialmente en nuestro medio a distintas concentraciones y durante distintos tiempos.

Una de las ventajas del presente estudio es el uso de cultivos primarios de células conjuntivales humanas normales. Frente a la mayoría de los estudios publicados en la literatura médica, que utilizan células de animales o líneas celulares inmortalizadas, la presente Tesis Doctoral logró optimizar un método sencillo para la generación de cultivos celulares primarios conjuntivales normales que, aunque son más difíciles de obtener y de mantener en cultivo, representan mucho mejor el comportamiento fisiológico normal de las células humanas y, por tanto, pueden dar una información más real (Oliveira AC, 2014) que la que ofrecen las células animales o humanas inmortalizadas, las cuales tienen en muchos casos anomalías genéticas (Spittel H, 2014). Aunque el estudio se ha realizado únicamente *in vitro*, el hecho de utilizar estos tipos

celulares facilita la validez externa de los resultados del estudio y su extrapolación a la clínica humana. Además esta Tesis Doctoral es novedosa, ya que de toda la bibliografía revisada, sólo otro grupo de trabajo ha valorado la citotoxicidad de los análogos de prostaglandinas mediante cultivos celulares procedentes de pacientes (Kim EJ, 2013).

Además, para estudiar la citotoxicidad de los fármacos en las células conjuntivales humanas, en esta Tesis Doctoral se han utilizado tres métodos diferentes que han mostrado una buena correlación entre sí. El hecho de no limitarse a una sola técnica, sino a una combinación de métodos basados en diferentes mecanismos de acción, podría contribuir a aumentar la consistencia de los resultados y la validez interna del estudio. Algunos investigadores sugieren que la combinación de métodos enfocados hacia un objetivo común garantiza la fiabilidad de los resultados (Martín-Piedra MA, 2014). En nuestro trabajo hemos estudiado la viabilidad celular usando ensayos que valoran diferentes estructuras o funciones celulares. De modo que la aplicación de tres técnicas diferentes permitió evaluar la viabilidad celular de varios modos. Por un lado, la utilización de las técnicas MTT y WST-1 permitió cuantificar la actividad enzimática mitocondrial a dos niveles distintos, con el valor añadido de que el WST-1 nos da información adicional sobre la proliferación de las células estudiadas. Por otro lado, el uso de la técnica mixta LIVE/DEAD permitió evaluar al mismo tiempo el metabolismo de las enzimas citoplasmáticas (esterasas citosólicas) y la integridad de la membrana plasmática mediante un colorante vital. Esta aproximación combinatoria de varias técnicas se utilizó previamente para la determinación de la viabilidad de células humanas con gran fiabilidad y especificidad (Garzón I, 2012b) (Martín-Piedra MA, 2014) (Garzón I, 2012). Así, los resultados de este trabajo revelaron que la dosis letal 50 calculada para cada uno de los fármacos fue muy diferente para cada técnica de análisis utilizada. De hecho, las DL50 más altas correspondieron a los análisis realizados con la técnica LIVE/DEAD, lo cual es compatible con un proceso de muerte celular en el que las esterazas citoplasmáticas no son funcionales y la membrana celular está fragmentada. En

cambio, los valores obtenidos para las otras dos técnicas son muy inferiores, puesto que se relacionan con la funcionalidad mitocondrial y la proliferación, procesos que se alterarían con dosis muy inferiores a las necesarias para dañar la membrana celular (Martín-Piedra MA, 2014) (Martín-Piedra MA, 2013) (Oliveira AC, 2014).

Otro aspecto importante a destacar en esta Tesis Doctoral, es que se han investigado los cuatro análogos de prostaglandinas disponibles en el mercado, ofreciendo una información muy completa que permite analizar y comparar la citotoxicidad de todo un grupo terapéutico que, además es el más utilizado como tratamiento médico del glaucoma (Tanna AP, 2015) (Ishida N, 2006). Otros estudios previos, sin embargo, comparan la toxicidad celular producida por fármacos pertenecientes a diferentes grupos terapéuticos hipotensores (Terai N, 2009) (Pisella PJ, 2004), lo que dificulta la interpretación de los resultados obtenidos. En nuestro caso, el análisis global de este grupo de fármacos podría contribuir a una mejor planificación terapéutica de los análogos de prostaglandinas de uso común en oftalmología.

Por otro lado, el hecho de estudiar un gran rango de concentraciones de análogos de prostaglandinas (100%, 50%, 25%, 5%, 1% y 0,1%) y tanto tiempos cortos como tiempos largos de exposición (5 min, 30 min, 1h, 6h y 24h), aporta una gran cantidad de información a los resultados del presente estudio, lo cual podría ayudar a una mejor comprensión y conocimiento del efecto citotóxico de los productos analizados sobre las células conjuntivales estromales humanas cultivadas. El hecho de haber analizado ambas variables -concentración y tiempo- aumenta la fiabilidad de los resultados y garantiza una mejor caracterización del producto frente a trabajos centrados únicamente en ciertas concentraciones y tiempos concretos (Guenoun JM, 2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los cuatro productos comerciales analizados tienen cierto grado de citotoxicidad sobre las células conjuntivales humanas. Aunque este hecho podría parecer

sorprendente, es bien conocido que todos los fármacos presentan cierto nivel de toxicidad en determinadas condiciones (Oliveira AC, 2014), lo cual obliga a realizar estudios integrales como el que se realizó en esta Tesis Doctoral.

Numerosos trabajos previos demostraron que la severidad del daño celular inducido por fármacos parece seguir un patrón dosis-dependiente (Epstein SP, 2009) (Baudouin C, 2010) (Oliveira AC, 2014). Por ese motivo, en este estudio experimental hemos considerado un amplio rango de dosis, desde 0% hasta 100% de concentración de cada análogo de prostaglandinas en cada cultivo celular. Así, se observó que la concentración de fármaco era determinante en el efecto citotóxico sobre células conjuntivales humanas para los cuatro productos analizados, de tal modo que a mayor concentración, mayor era el daño observado en los cultivos celulares, encontrándose una clara correlación negativa en los tres métodos de viabilidad celular utilizados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigadores en trabajos previos (De Saint Jean MB, 1999) (Oliveira AC, 2014) (Epstein SP, 2009), y sugieren la necesidad de encontrar nuevos fármacos que sean efectivos a menores concentraciones.

A este respecto, nuestro trabajo permitió calcular la dosis letal 50 de cada uno de los fármacos, determinando la existencia de importantes diferencias entre los diferentes análogos de prostaglandinas. De acuerdo con estos valores, *latanoprost* es el fármaco que produce mayores efectos citotóxicos sobre las células conjuntivales humanas a menores concentraciones, bastando un 8-9% para alterar la función mitocondrial y la proliferación celular del 50% de las células, y alrededor del 31% para dañar la membrana celular. Por el contrario, *tafluprost* parece ser el fármaco menos citotóxico, siendo necesarias concentraciones muy elevadas de este producto para dañar la mitad de las células tanto a nivel mitocondrial y de proliferación (alrededor del 36-52%) como a nivel de la membrana plasmática (77%). Todo ello sugiere que la citotoxicidad inducida por análogos de prostaglandinas tiene un comportamiento dosis-dependiente, lo cual podría contribuir a una selección

más adecuada de los fármacos a utilizar clínicamente en pacientes con glaucoma. Dentro de lo posible, sería deseable utilizar aquéllos fármacos que demostraron bioseguridad a mayores concentraciones.

En cualquier caso, hemos de tener en cuenta el factor de la dilución *in vivo*. Como se explicó en la introducción de esta Tesis Doctoral, se ha demostrado que la medicación instilada en la superficie ocular suele diluirse significativamente en la lágrima, encontrándose en la superficie ocular del paciente hasta el 25% de la concentración que se instiló (Maurice DM, 2002). Además, sólo el 5-20% del fármaco penetra en la córnea y la esclera alcanzando los tejidos intraoculares. Por todo ello, podemos afirmar que la concentración efectiva que alcanza las células del paciente *in vivo* debería ser equiparable a las concentraciones más bajas utilizadas *in vitro* y, por tanto, podrían ofrecer escasa citotoxicidad sobre el paciente. Además, el medio ambiente de las células conjuntivales *in vivo* es muy diferente del que ofrecen los cultivos celulares, y es de esperar que la matriz extracelular rica en colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas (Alfonso-Rodríguez CA, 2014) (Oliveira AC, 2013) y otras sustancias existentes en la conjuntiva y en la superficie ocular ofrezcan cierto efecto tampón sobre la población celular inmersa en esta matriz extracelular. Todo esto sugiere que los datos obtenidos *in vitro* en el presente estudio deberían ser interpretados con cautela a la hora de su translación clínica al paciente.

Otro parámetro fundamental a la hora de evaluar los efectos citotóxicos de los fármacos es el tiempo de exposición (Mantelli F, 2011). Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento médico del glaucoma requiere del uso de colirios de forma continuada en el tiempo. Este hábito repetitivo podría conducir a la aparición de irritación ocular y efectos indeseados (Baudouin C, 2008). En el presente trabajo, se observó que el tiempo de exposición jugaba un papel menos relevante que la concentración en el efecto citotóxico de los productos, de tal modo que, aunque a mayor tiempo de exposición se observó una tendencia hacia un mayor daño en los cultivos celulares, en general se

apreciaron pocas diferencias entre los distintos tiempos de exposición para los tiempos más largos. Es llamativo que la correlación entre la viabilidad y el tiempo fue significativa únicamente para dos de las técnicas analizadas, pero no para MTT. Además, el efecto citotóxico encontrado para tiempos largos (1h, 6h y 24h) difirió de los tiempos cortos (5 y 30 minutos), los cuales parecían presentar menor toxicidad en la mayoría de los casos, especialmente a los 5 minutos. Este fenómeno revela que el patrón citotóxico se establece ya a tiempos cortos y se mantiene inalterado a tiempos más largos, sugiriendo que el efecto tóxico es rápido y, al contrario de lo que ocurría con la concentración, es poco dependiente del tiempo de exposición. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos investigadores en trabajos previos (Hong S, 2006) (De Saint Jean MB, 1999) (Oliveira AC, 2014) (Epstein SP, 2009) y sugieren la necesidad de encontrar nuevos fármacos que sean efectivos y presenten muy corta vida media. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que el tiempo de contacto del medicamento con la superficie ocular es corto (1 ó 2 minutos) debido al recambio lagrimal (Sjöquist B, 1998) (Bourlais CL, 1998), con lo que la citotoxicidad real en el paciente es, probablemente, menor que la que se encuentra en estudios *in vitro*. Sin embargo, trabajos previos ya demostraron que periodos cortos de exposición a estos fármacos ya son capaces de producir daños en la superficie ocular (Hong S, 2006). Aunque el periodo de contacto de estos fármacos con la superficie ocular suele ser breve, es muy interesante estudiar asimismo los tiempos más largos, que si bien no se producen en condiciones reales, es posible que sus efectos puedan mimetizar a los que se producirían en exposiciones crónicas, como es habitual en pacientes con glaucoma.

Uno de los resultados más llamativos de este trabajo es la diferente citotoxicidad encontrada para los cuatro análogos de prostaglandinas. Aunque la estructura tridimensional de las cuatro moléculas es muy similar, existen diferencias notables en cuanto a los radicales químicos existentes en cada uno de los análogos de prostaglandinas analizados, lo cual nos podría inducir a pensar que las diferencias observadas podrían ser debidas al principio activo.

Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que es preciso recordar que el efecto tóxico puede deberse al principio activo, a la presencia o ausencia de conservante, o a los excipientes utilizados en la formulación, y que el daño celular podría ser producido tanto por los principios activos empleados, como por los conservantes y excipientes que se usan en la formulación comercial (Baudouin C, 1999) (Pinheiro R, 2015).

De los cuatro análogos de prostaglandinas evaluados en esta Tesis Doctoral, tres de ellos (*bimatoprost*, *travoprost* y *latanoprost*) utilizan el cloruro de benzalconio (BAK) como conservante en su formulación, mientras que *tafluprost* se presenta en envase monodosis sin conservante. Es interesante observar como esta última prostaglandina ha resultado ser menos citotóxica en nuestro trabajo, lo cual puede ser debido precisamente a la ausencia de BAK en su presentación. El BAK, aun siendo una sustancia segura, se asocia con cierto grado de toxicidad, tal como han documentado ampliamente estudios en animales y líneas celulares humanas, e incluso se ha relacionado con el fracaso de la cirugía oftálmica filtrante para tratar el glaucoma (Broadway D, 1993) (Baudouin C, 2008). En una revisión de estudios prospectivos, observacionales y cruzados, se analizó el papel del BAK presente en los colirios oftalmológicos, comparando el efecto producido por un determinado fármaco en dos preparaciones: una con conservante y otra sin conservante, poniéndose de manifiesto el efecto citotóxico del BAK (Baudouin C, 2010). Además, en muchas ocasiones, la progresión de la enfermedad glaucomatosa obliga a asociar más de un colirio, lo que se relaciona a un mayor daño e incremento de efectos secundarios (Fechtner RD, 2010) y a su vez, supone un factor de riesgo para el fracaso de una eventual cirugía filtrante (Broadway DC, 2001). Además, los análogos de prostaglandinas producen en exposiciones cortas un incremento de las células caliciformes conjuntivales, aunque en exposiciones prolongadas hay un descenso de las mismas, probablemente en relación con los efectos citotóxicos tardíos del conservante (Moreno M, 2003). Como se expuso en la introducción de esta Tesis Doctoral, existe abundante bibliografía que analiza el daño producido por el BAK sobre la superficie ocular

(Baudouin C, 2010). Numerosos trabajos demostraron que los efectos citotóxicos de este conservante son dosis-dependientes, pudiendo causar lisis celular a concentraciones iguales o superiores a 0.1% y apoptosis y necrosis celular a concentraciones tan bajas como 0,0001% (De Saint Jean MB, 1999) (De Saint Jean MC, 2004) (Kim EJ, 2013).

Otros trabajos también han demostrado que *tafluprost* se asoció a mejores parámetros de viabilidad celular, obtenido resultados similares, pero han utilizado en su desarrollo células inmortalizadas (Ayaki M, 2012) (Pellinen P, 2012). Como se ha comentado anteriormente, este fármaco es el único estudiado que no tiene conservantes en su presentación comercial, mientras que los otros compuestos cuentan con BAK como conservante, lo que sugiere que éste podría ser el responsable del aumento de toxicidad observado. Por el contrario, el análogo de prostaglandina que mostró un efecto más citotóxico, fue el *latanoprost*, que además es el compuesto analizado con mayor concentración de BAK de todos (0,02%). Este hecho reforzaría la sospecha del efecto citotóxico del conservante. Resultados parecidos se han observado en estudios con animales, donde las presentaciones de análogos de prostaglandinas sin BAK han mostrado menor citotoxicidad en la superficie ocular. En concreto, fueron *tafluprost* sin conservantes y *travoprost* con el conservante Polyquad® (Kim JH, 2015) o estudios sobre cultivos de células corneales y conjuntivales inmortalizadas (Pellinen P, 2012). Asimismo, existen otros estudios farmacológicos que comparan otros principios activos de uso en la superficie ocular en su presentación con y sin conservantes, siendo la formulación sin conservantes más respetuosa con la superficie ocular y mejor tolerada por el paciente en la mayoría de los casos (Goldberg I, 2015). Esto reforzaría la idea de que el BAK podría ser responsable del daño celular (Iester M, 2014) (Ciancaglini M, 2008) (Frezzotti P, 2014) (Pauly A, 2012).

Por otro lado, trabajos previos detectaron un fenómeno farmacológico interesante al analizar la toxicidad inducida presentaciones comerciales con BAK. En concreto, se observó que algunos análogos de prostaglandinas

podrían tener un papel citoprotector sobre las células de la superficie ocular cuando se aplicaban colirios con BAK (Guenoun JM, 2005), lo cual podría explicarse por la acción antioxidante de los análogos de prostaglandinas. Otro trabajo llevado a cabo por Ayaki, compara la toxicidad inducida por diferentes colirios para el glaucoma entre los que figuraban los análogos de las prostaglandinas, betabloqueantes, inhibidores de la anhidrasa carbónica y combinaciones fijas y las concentraciones de BAK de los mismos, y se observó que los grupos tratados con análogos de prostaglandinas tenían mejor viabilidad celular que el resto, sugiriendo de nuevo que éstos pueden jugar un rol protector que contrarreste el daño producido por el BAK (Ayaki M, 2012). Asimismo, recientes trabajos llevados a cabo por Niwano y colaboradores también parecen confirmar estos resultados (Niwano Y, 2014).

En los últimos años, se ha venido produciendo una mejora en la presentación farmacológica de todos los fármacos utilizados en la superficie ocular, buscando fórmulas que sean más respetuosas con ésta (Stalmans I, 2013). Como consecuencia de esta preocupación, recientemente han aparecido nuevas formulaciones de los mismos análogos de prostaglandinas en los que se ha cambiado su formulación comercial:

- En la actualidad, el *bimatoprost* se puede encontrar de dos formas distintas: una presentación novedosa sin conservantes y otra en la cual se ha reducido la concentración del principio activo de 0,03% a 0,01%, pero aumentando cinco veces la cantidad de conservante (de 0,005% a 0,02% de BAK) para poder alcanzar mayores concentraciones terapéuticas en el interior del ojo. Hasta la fecha, no existen estudios que comparen los efectos citotóxicos de ambas formulaciones.

- El *latanoprost* de nueva formulación tiene una presentación sin conservantes, pero a la que se ha introducido un nuevo excipiente denominado *macrogolglycerol hydroxystearate* 40, que aparece a altas dosis y se ha relacionado con inflamación y citotoxicidad en cultivos de

células corneales inmortalizadas (Pinheiro R, 2015) (Smedowski A, 2014).

- Las nuevas formulaciones de *travoprost* han sustituido el BAK por otros conservantes: *Poliquaternium-1* (Polyquad[®]) y, en algunos países, por *SofZia*[®], que son menos citotóxicos (Labbé A, 2006) (Ammar DA, 2010).

La mayoría de los estudios que analizan las nuevas presentaciones se centran en la eficacia hipotensora de los nuevos fármacos, habiéndose observado que estos nuevos fármacos presentan una eficacia similar a la de los fármacos estudiados en esta Tesis Doctoral, pero podrían presentar mejor perfil de seguridad (Wang YQ, 2013). Sin embargo aún hay poca información sobre la citotoxicidad de estas nuevas presentaciones de análogos de prostaglandinas en comparación con las formulaciones previas. Estudios futuros deberán comparar ambos tipos de fármacos y determinar los efectos citotóxicos de éstos.

En resumen, podemos decir que la toxicidad ocular es una preocupación creciente en los oftalmólogos. Es necesario encontrar una formulación que sea efectiva en el control de la tensión ocular pero, al mismo tiempo, sea respetuosa con los tejidos oculares. En esta búsqueda, son útiles los estudios de viabilidad celular como los llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, porque ayudan a evaluar y establecer el daño que se produce en el ojo. En este sentido, nuestro trabajo podría ayudar a una mejor comprensión de la citotoxicidad de estos fármacos, lo que es fundamental para el desarrollo de nuevas terapias con menores efectos secundarios sobre la superficie ocular, y las diferentes estructuras del ojo humano.

Como se deduce de nuestros resultados, el uso de agentes hipotensores oculares libres de conservantes debería ser de preferencia en la medida de lo posible, sobre todo en aquellos pacientes que tienen enfermedades asociadas

como síndrome de ojo seco, rosácea, dermatitis atópica y alergia a los conservantes (Stalmans I, 2013), así como en pacientes en edad pediátrica.

Los resultados que se derivan del trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral podrían ser el punto de partida para nuevas investigaciones que estudien en profundidad los efectos de los colirios hipotensores oculares. Asimismo, estudios futuros deberían determinar con más claridad el papel de los conservantes en las diferentes formulaciones de análogos de prostaglandinas utilizando un grupo de estudio en el que se utilice únicamente BAK. De igual modo, la reciente aparición de nuevas formulaciones de análogos de prostaglandinas, hace necesario el estudio y comparación de la citotoxicidad inducida por cada principio activo y por cada una de las formulaciones farmacéuticas actuales para determinar cuál de ellas es al mismo tiempo, eficaz y respetuosa para la superficie ocular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, nos permiten inferir las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de los métodos y técnicas desarrollados y optimizados en esta Tesis Doctoral, permitió establecer cultivos celulares primarios de células estromales conjuntivales humanas a partir de muestras de biopsias operatorias. Dichas células presentan una morfología ortotípica y son una fuente adecuada para la realización de ensayos de viabilidad celular en oftalmología.

2. El análisis de los efectos citotóxicos de los colirios de análogos de prostaglandinas (*bimatoprost*, *latanoprost*, *tafluprost* y *travoprost*) sobre los cultivos primarios de células conjuntivales utilizando ensayos metabólicos basados en la detección colorimétrica con sales de tetrazolio (WST-1) permite afirmar que los cuatro fármacos presentan cierto grado de citotoxicidad, existiendo una correlación negativa significativa tanto con el tiempo de exposición como con la concentración del fármaco. Los mayores efectos citotóxicos se observaron para el caso del *latanoprost*, siendo el *tafluprost* el fármaco menos citotóxico. Estos resultados sugieren que la actividad enzimática mitocondrial y la proliferación celular se ven alteradas de forma significativa a mayores concentraciones y tiempos de exposición, por lo que sería recomendable utilizar fármacos efectivos a concentraciones bajas y tiempos de exposición cortos.

3. El análisis de los efectos citotóxicos de los colirios de análogos de prostaglandinas (*bimatoprost*, *latanoprost*, *tafluprost* y *travoprost*) sobre los cultivos primarios de células conjuntivales utilizando ensayos metabólicos basados en el método MTT demostró la existencia de efectos citotóxicos asociados a cada uno de los cuatro fármacos analizados, especialmente para *latanoprost*, mientras que *tafluprost* demostró menores grados de citotoxicidad. Los efectos citotóxicos de todos estos fármacos presentaron una correlación

negativa significativa con la concentración de cada formulación, pero no con el tiempo de exposición. Estos resultados confirman las alteraciones del metabolismo mitocondrial inducidas por estos fármacos y evaluadas a dos niveles diferentes, y sugieren la necesidad de utilizar formulaciones efectivas a bajas concentraciones.

4. La evaluación de los efectos citotóxicos de los colirios de análogos de prostaglandinas (*bimatoprost*, *latanoprost*, *tafluprost* y *travoprost*) sobre los cultivos primarios de células conjuntivales utilizando ensayos mixtos metabólicos y de exclusión de colorantes vitales LIVE/DEAD, confirman la citotoxicidad de los cuatro fármacos, siendo mayor en *latanoprost* y menor en *tafluprost*. Estos efectos citotóxicos, que fueron menos acusados que en el caso del WST-1 y el MTT, se correlacionaron negativamente con el tiempo de incubación y la concentración del fármaco, y sugieren que las alteraciones de las esterasas citoplasmáticas y la ruptura del núcleo celular requiere mayores dosis y tiempos de incubación que las alteraciones del metabolismo mitocondrial anteriormente descritas. Estos datos vuelven a apoyar la idea de recomendar dosis bajas durante tiempos cortos.

5. Todos estos resultados mostraron grandes niveles de correlación entre las diferentes técnicas, lo cual aumenta la consistencia y la validez interna de los resultados, y permitieron establecer el patrón de citotoxicidad de los análogos de prostaglandinas utilizadas en cultivos de células conjuntivales humanas. Aunque todos los compuestos mostraron un perfil de citotoxicidad dosis-dependiente, podemos concluir que el fármaco con menor incidencia sobre la biología de la población celular analizada fue el *tafluprost*, lo que podría deberse a la ausencia de conservantes en la formulación comercial de este análogo de prostaglandinas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez de Toledo J, Benítez del Castillo JM, Duch Tuesta S, García Feijó J, Merayo Lloves J, Muñoz-Negrete FJ. *Documento de consenso sobre el mantenimiento de la superficie ocular y su tratamiento*. Madrid: MSD, 2011.
2. AAO, American Academy of Ophthalmology, Reidy J. *Enfermedades de la superficie ocular y córnea*. Barcelona: Elsevier, 2013.
3. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. «Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa.» *J Tissue Eng Regen Med* 1, nº 5 (2007): 350-9.
4. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Muñoz-Avila JI, García JM, Crespo PV, González-Andrades M, Campos A. «Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis.» *J Cell Physiol* 211, nº 3 (2007b): 692-8.
5. Alfonso-Rodríguez CA, Garzón I, Garrido-Gómez J, Oliveira AC, Martín-Piedra MÁ, Scionti G, Carriel V, Hernández-Cortés P, Campos A, Alaminos M. «Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in dupuytren's disease.» *PLoS One* 9, nº 11 (Nov 2014): e112457. doi: 10.1371/journal.pone.0112457. eCollection 2014.
6. Alsbirk PH. «Primary open angle-closure glaucoma: oculometry, epidemiology and genetixs in a high risk population.» *Acta Ophthalmol* 54 (1976): 5-31.
7. Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF,. «Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea.» *Am J Ophthalmol*, nº 135(5) (May 2003): 584-90.
8. Ammar DA, Noecker RJ, Kahook MY. «Effects of benzalkonium chloride- and polyquad-preserved combination glaucoma medications on cultured human ocular surface cells.» *Adv Ther* 28, nº 6 (Jun 2011): 501-510.
9. Ammar DA, Noecker RJ, Yahook MY. «Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells.» *Adv Ther* 27, nº 11 (Nov 2010): 837-45.
10. Anderson RA. «Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells.» *Invest Ophthalmol Vis Sci*, nº 16(2) (Feb 1977): 161-6.
11. Aptel F. «Intraocular pressure-lowering combination therapies with prostaglandin analogues.» *Drugs* 72, nº 10 (Jul 2012): 1355-71.

12. Aptel F, Cucherat M, Denis P. «Efficacy and tolerability of prostaglandin analogs: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials.» *J Glaucoma*. 2008 Dec;17(8):667-73. 17 (Dec 2008): 667-73.
13. Arffat RC. *Grayson: Enfermedades de la córnea*. Madrid: Harcourt Brace, 1999.
14. Aritürk N, Oge I, Erkan D, Süllü Y, Sahin M. «The effects of nasolacrimal canal blockage on topical medications for glaucoma.» *Acta Ophthalmol Scand*. 74, n° 4 (Aug 1996): 411-3.
15. Ayaki M, Iwasawa A, Niwano T. «Cell viability score as an integrated indicator for cytotoxicity of benzalkonium chloride-containing antiglaucoma eyedrops.» *Biocontrol Sci* 17, n° 3 (2012): 121-128.
16. Ayaki M, Yaguchi S, Iwasawa A, Koide R. «Cytotoxicity of ophthalmic solutions with and without preservatives to human corneal endothelial cells, epithelial cells and conjunctival epithelial cells.» *Clin Experiment Ophthalmol* 26, n° 6 (Aug 2008): 553-9.
17. Barabino S, Antonelli S, Cimbolini N, Mauro V, Bouzin M. «The effect of preservatives and antiglaucoma treatments on the ocular surface of mice with dry eye.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55, n° 10 (Sep 2014): 6499-504.
18. Barishak YR. «Embryology of the eye and its adnexae» *Dev Ophthalmol* 24 (1992): 1-142.
19. Baudouin C. «The pathology of the dry eye» *Surv Ophthalmol* 45, n° Suppl. 2 (2001): 211-220.
20. Baudouin C. «Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma.» *Acta Ophthalmol* 86, n° 7 (Nov 2008): 716-26.
21. Baudouin C, de Lunardo C. «Short-term comparative study of topical 2% carteolol with and without benzalkonium chloride in healthy volunteers.» *Br J Ophthalmol* 82, n° 1 (1998): 39-42.
22. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. «Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly.» *Prog Retin Eye Res* 29, n° 4 (Jul 2010): 212-334.
23. Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, Béchettoille A. «Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs: human and animal studies.» *Ophthalmology* 106, n° 3 (1999): 556-563.
24. Bean GW, Camras CB. «Commercially available prostaglandin analogs for the reduction of intraocular pressure: similarities and differences.» *Surv Ophthalmol* 53, n° Suppl1 (Nov 2008): S69-84.
25. Becquet F, Moldovan MS, Erraiche M, Baudouin C. «Curr Eye Res .» *Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneconjunctival surface* 17 (1998): 419-495.

26. Beuerman RW, Pedroza L. «Ultrastructure of the human cornea.» *Microsc Res Tech.* 33, nº 4 (Mar 1996): 320-35.
27. Bourlais CL, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverage R. «Ophthalmic Drug Delivery Systems. Recent Advances.» *Prog Retin Eye Res* 7, nº 1 (Jan 1998): 33-58. Review.
28. Brandt JD, Cantor LB, Katz LJ, Batoosingh AL, Chou C, Bossowska I, Group, Ganfort Investigators. «Bimatoprost/timolol fixed combination: a 3-month double-masked, randomized parallel comparison to its individual components in patients with glaucoma or ocular hypertension.» *J Glaucom* 17, nº 3 (2008): 211-216.
29. Broadway D, Grierson I, Hitchings R. «Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva.» *Br J Ophthalmol* 77, nº 9 (1993): 590-6.
30. Broadway DC, Chang LP. «Trabeculectomy, risk factors for failure and the preoperative state of the conjunctiva.» *J Glaucoma* 10, nº 3 (Jun 2001): 237-49.
31. Broadway DC, O'Brien C, Hitching RA. «Adverse effects of topical antiglaucoma medication II.» *Arch Ophthalmol* 112 (1994b): 1446-1454.
32. Broman AT, Quigley HA, West SK, Katz J, Munoz B, Bandeen-Roche K, Tielsch JM, Friedman DS, Crowston J, Taylo HR, Varma R, Leske MC, Bengtsson B, Heijil A, He M, Foster PJ. «Estimating the rate of progressive visual field damage in those with open-angle glaucoma, from cross-sectional data.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 (Jan 2008): 66-76.
33. Burr J, Azuara-Blanco A, Avenell A, Tuulonen A. «Medical versus surgical interventions for open angle glaucoma.» *Cochrane Database Syst Rev* 12, nº 9 (Sep 2012): CD004399. doi: 10.1002/14651858.CD004399.pub3.
34. Castro-Muñozledo F. «Review: Corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing.» *Mol Vis* 19 (2013): 1600-13.
35. Charnock C. «Are multidose over-the-counter artificial tears adequately preserved?» *Cornea* 25, nº 4 (May 2006): 32-7.
36. Chauhan BC, Garway-Health DF, Goñi FJ, Rossetti L, Bengtsson B, Viswanathan AC, Heijil A. «Practical recommendations for measuring rates of visual field change in glaucoma.» *Br J Ophthalmol* 92 (2008): 569-73.
37. Cheng JW, Cheng SW, Gao LD, Lu GC, Wei RL. «Intraocular pressure-lowering effects of commonly used fixed-combination drugs with timolol: a systematic review and meta-analysis» *PLoS One* 7, nº 9 (Sep 2012): e45079. doi: 10.1371/journal.pone.0045079.
38. Ciancaglini M, C. P., Agnifili L, Nubile M, Fasanella V, Lanzini M, Calienno R, Mastropasqua L. «An in vivo confocal microscopy and impression cytology

- analysis of preserved and unpreserved levobunolol induced conjunctival changes.» *Eur J Ophthalmol* 18, nº 3 (2008): 400-407.
39. Clineschmidt CM, Williams RD, Snyder E, Adamsons IA. «A randomized trial in patients inadequately controlled with timolol alone comparing the dorzolamide-timolol combination to monotherapy with timolol or dorzolamide. Dorzolamide-Timolol Combination Study Group.» *Ophthalmology* 105, nº 10 (Oct 1998): 1952-1959.
40. Congdon N, Wang F, Tielsch JM. «Issues in the epidemiology and population-based screening of primary angle-closure glaucoma.» 46 (1992): 81-86.
41. Cuadrado Escamilla, José Luis . «Estudio anatómico-clínico y epidemiológico de la queratitis laminar difusa como complicación postquirúrgica de la fotoqueratomileusis (LASIK).» Valencia: Universidad de Valencia, 2008.
42. Danesh-Meyer HV. «Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions.» *Curren Opin Ophthalmol* 22, nº 2 (Mar 2011): 78-86.
43. De Saint Jean MB, Bringuier AF, Bauchet A, Feldmann G, Boudouin C. «Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cell line.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (1999): 619-630.
44. De Saint Jean MC, Di Nolfo M, Roman S, Lozato P, Warnet JM, Brignole F,. «Comparison of morphological and functional characteristic of primary-cultured human conjunctival epithelium and of Wong-Kilbourne derivate of Chang conjunctival cell line.» *Exp Eye Res* 78 (2004): 257-274.
45. Debbage P. «Distinctive structural and cytoskeletal properties of the long-surviving neurons in cell cultures of embryonic spinal cord.» *Neuroscience* 14, nº 1 (1985): 207-224.
46. del Buey Salas, M^a Angeles, Peris Martínez, Cristina. *Biomecánica y arquitectura corneal*. Barcelona: Elsevier España, 2014.
47. Denis P, Lafuma A, Khoshnood B, Mimaud V, Berdeaux G. «A meta-analysis of topical prostaglandin analogues intra-ocular pressure lowering in glaucoma therapy.» *Curr Med Res Opin* 23, nº 3 (Mar 2007): 601-8.
48. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. «Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer).» *Ophthalmology* 120, nº 9 (Sep 2013): 1778-85.
49. Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, Wuskell JP, Loew LM. «Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes.» *Biophys J* 53, nº 5 (May 1988): 795-94.
50. Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, Asbell PA. «Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells.» *Ocul Pharmacol Ther J*, nº 25 (2009): 113-9.

51. Erie JC, Hodge DO, Gray DT. «The incidence of primary angle-closure glaucoma in Olmsted County, Minnesota.» *Arch Ophthalmol* 115 (1997): 177-181.
52. European Glaucoma Society. *Terminología y Pautas para el Glaucoma*. Savona: Dogma, 2008.
53. Fan BJ, Leung YF, Wang N, Lam SC, Liu Y, Tam OS, Pang OC. «Genetic and environmental risk factor for primary open glaucoma.» *Chin Med J (Engl)* 117 (2004): 706-10.
54. FDA. *Guidance for industry container and closure system integrity testing as a component of the stability protocol for sterile products*. Rockville, MD, 2008.
55. Fechtner RD, Godfrey DG, Budenz D, Stewart JA, Stewart WC, Jasek MC. «Prevalence of ocular surface complaints in patients with glaucoma using topical intraocular pressure-lowering medications.» *Cornea* 29, n° 6 (Jun 2010): 618-21.
56. Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, Serra LM, Reanrd JP, Stefánsson E. «The impact of ocular blood flow in glaucoma.» *Pro Retina Eye Res* 21, n° 4 (Jul 2002): 359-93.
57. Freeman PD, Yahook MY. «Preservatives in topical ophthalmic medications: historical and clinical perspectives.» *Experte Recv. Ophthalmol* 4, n° 1 (2009): 59-64.
58. Frezzotti P, Fogagnolo P, Haka G, Motolese I, Iester M, Bagaglia SA, Mittica P, Menicacci C, Rossetti L, Motolese E. «In vivo confocal microscopy of conjunctiva in preservative-free timolol 0.1% gel formulation therapy for glaucoma.» *Acta Ophthalmol* 92, n° 2 (Mar 2014): e133-40.
59. Furrer P, Mayer JM, Gurny R. «A comparative study of the ocular tolerance of timolol-based preparations: the influence of preservatives on ocular tolerance.» *J Fr Ophthalmol* 24: 13-19. 24 (2001): 13-19.
60. Garzón I, Carriel V, Marín-Fernández AB, Oliveira AC, Garrido-Gómez J, Campos A, Sánchez-Quevedo Mdel C, Alaminos M. «A combined approach for the assessment of cell viability and cell functionality of human fibrochondrocytes for use in tissue engineering.» *PLoS One* 7, n° 12 (2012b): e51961. doi: 10.1371/journal.pone.0051961. Epub 2012 Dec 1.
61. Garzón I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martín-Piedra MA, García-Honduvilla N, Buján J, Campos A, Alaminos M. «Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy.» *Tissue Eng Part C Methods* 18, n° 6 (Jun 2012): 408-19.
62. Gemenetzi M, Yang Y, Lotery AJ. «Current concepts on primary open-angle glaucoma genetics: contribution to disease pathophysiology and future treatment.» *Eye (Lond)* 26 (2012): 355-69.

63. Germundsson J, Karanis G, Fagerholm P, Lagali N. «Age-Related Thinning of Bowman's Layer in the Human Cornea In Vivo.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, nº 9 (Sep 2013): 6143-9.
64. Gheghel D, Orgül S, Gugleta K, Gekkieva M, Flammer J. «Relationship between ocular perfusion pressure and retrobulbar blood flow in patients with glaucoma with progressive damage.» *Am J Ophthalmol* 130, nº 5 (Nov 2000): 597-605.
65. Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tislade A. «Anchoring fibrils from a complex network in human and rabbit cornea.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 (1987): 212.
66. Gipson IL, Anderson RA. «Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16 (1977): 161.
67. Giuliano KA, Taylor KM. «Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery.» *Trends Biotechnol* 16, nº 3 (1998): 135-140.
68. Glyn RJ, Seddon JM, Krug JH, Sahagian CR, Chiavelli MR, Campion EW. «Falls in elderly patients with glaucoma.» *Arch Ophthalmol* 109 (1991): 205-210.
69. Goldberg I, Graham SL, Crowston JG, d'Mellow G, y Australian and New Zealand Glaucoma Interest Group. «Clinical audit examining the impact of benzalkonium chloride-free anti-glaucoma medications on patients with symptoms of ocular surface disease.» *Clin Experiment Ophthalmol* 43, nº 3 (April 2015): 214-220.
70. Goñi FJ, Group Brimonidine/Timolol Fixed Combination Study. «12-week study comparing the fixed combination of brimonidine and timolol with concomitant use of the individual components in patients with glaucoma and ocular hypertension.» *Eur J Ophthalmol* 15, nº 5 (2005): 581-590.
71. Gordon MK, Foley JW, Birk DE, Fitch JM, Linsemayer TF. «Type V collagen and Bowman's membrane.» *J Biol Chem* 269 (1994): 24959-66.
72. Greig SL, Deeks ED. «Brinzolamide/brimonidine: a review of its use in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension.» *Drugs Aging* 32, nº 3 (Mar 2015): 251-60.
73. Grieshaber MC, Mozaffarieh M, Flammer J. «What is the link between vascular dysregulation and glaucoma?» *Surv Ophthalmol* 22, nº Supple 2 (Nov 2007): 144-154.
74. Grodum K, Heilj A, Bengtsson B. «A comparison of glaucoma patients identified through mass screening and in routine clinical practice.» *Acta Ophthalmol Scand* 80, nº 6 (2002): 627-631.
75. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. «In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost,

- travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells.» *Invest Ophthalmol Vis Sc* 46, nº 12 (Dec 2005): 4594-9.
76. Harding CV, et al. «A comparative study of corneal epithelial cell surfaces utilizing the scanning electron microscope.» *Invest Ophthalmol* , nº 13 (1974): 906.
77. Hayreh SS, Podhajsky P, Zimmerman MB. «Beta-blocker eyedrops and nocturnal arterial hypotension.» *Am J Ophthalmol* 8, nº 3 (Sep 1999): 301-9.
78. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hussein M et al. «Reduction intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial Early.» *Archives of Ophthalmology* 120, nº 10 (2002): 1268-1279.
79. Heijl A, Leske MC, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M,. «Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial.» *Arch Ophthalmol* 120 (2002): 1268-1279.
80. Higginbotham EJ, Hansen J, Davis EJ, Walt JG, Guckian A. «Glaucoma medication persistence with a fixed combination versus multiple bottles.» *Curr Med Res Opin* 25, nº 10 (Oct 2009): 2543-7.
81. Hong S, Lee CS, Seo KY, Seong GJ, Hong YJ. «Effects of topical antiglaucoma application on conjunctival impression cytology specimens.» *Am J Ophthalmol* 142, nº 1 (Jul 2006): 185-86.
82. Hutzelmann J, Owen S, Shedden, Adamsons I, Vargas E. «Comparison of the safety and efficacy of the fixed combination of dorzolamide/timolol and the concomitant administration of dorzolamide and timolol: a clinical equivalence studytimolol.» *Ophthalmology* 82, nº 11 (Nov 1998): 1249-53.
83. Iester M, Telani S, Frezzotti P, Motolese I, Figus M, Fogagnolo P, Perdicchi A, Beta-Blocker Study Group. «Ocular surface changes in glaucomatous patients treated with and without preservatives beta-blockers.» *J Ocul Pharmacol Ther* 30, nº 6 (Aug 2014): 476-81.
84. Ishida N, Odani-Kawabata N, Shimazaki A, Hara H. «Prostanoids in the therapy of glaucoma.» *Cardiovasc Drug Rev* 42, nº 1 (Spring 2006): 1-10.
85. Kahook MY. «Travoprost Z Ophthalmic solution: clinical safety and efficacy.» *Expert Rev Ophthalmol* 23, nº 5 (2007): 490-496.
86. Kahook MY, Moecker RJ. «Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with SofZia, latanoprost with 0,02% of benzalconium chloride, and preservatives-free artificial tears.» *Cornea* 27, nº 3 (2008): 339-343.
87. Kanski, Jack J. *Oftalmología clínica*. Barcelona: Elsevier España, 2004.
88. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ et al. «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* 120 (2002): 701-713.
89. Kass-Hansen M. «The histopathological changes of keratoconus.» *Acta Ophthalmol* 71 (1993): 411-4.
90. Kazt J, Sommer A. «Risk factors for primary open-angle glaucoma.» *Am J Prev Med* 4 (1988): 110-114.
91. Kim EJ, Kim YH, Kang SH, Lee KW, Park YJ. «In vitro effects of preservative-free and preserved prostaglandin analogs on primary cultured human conjunctival fibroblast cells.» *Korean J Ophthalmol* 27, n° 6 (Dec 2013): 446-53.
92. Kim JH, Kim EJ, Kim YH, Kim YI, Lee SH, Jung JC, Lee KW, Park YJ. «In Vivo Effects of Preservative-free and Preserved Prostaglandin Analogs: Mouse Ocular Surface Study.» *Korean J Ophthalmol* 29, n° 4 (Aug 2015): 270-9.
93. Kim MS, C. C., Kim JM, Chang HR, Woo HY. «Microbial contamination of multiple used preservative-free artificial tears packed in reclosable containers.» *Br J Ophthalmol* 79 (2008): 1518-1521.
94. Kingman, S. «Glaucoma is second leading cause of blindness globally.» *Bull World Health Organ* 82 (Nov 2004): 887-8.
95. Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, Okubo K. «Characteristics of the human ocular surface epithelium.» *Prog Retin Eye Res* 20, n° 5 (Sep 2001): 639-73.
96. Knupp C, Pinali C, Lewis PN, Parfitt GJ, Young RD, Meek KM, Quantock AJ. «The architecture of the cornea and structural basis of its transparency.» *Adv Protein Chem Struct Biol.* 78 (2009): 25-49.
97. Konstas AG, Quaranta L, Katsanos A, Riva I, Tsai JC, Giannopoulos T, Voudouragkaki IC, Paschalidou E, Floriani I, Haidich AB. «Twenty-four hour efficacy with preservative free tafluprost compared with latanoprost in patients with primary open angle glaucoma or ocular hypertension.» *Br J Ophthalmol.* 16 (May 2013): [Epub ahead of print].
98. Korte JM, Kaila T, Saari KM. «Systemic bioavailability and cardiopulmonary effects of 0.5% timolol eyedrops.» *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240, n° 6 (Jun 2002): 430-5.
99. Kuwabara T. «Current concepts in anatomy and histology of the cornea.» *Contact Intraocular Lens Med J* 4 (1978): 101.
100. Labbé A, Pauly A, Liang H et al. «Comparison toxicological profiles of benzalkonium chloride and polyquaternium-1: an experimental study.» *J Ocu Pharmacol*, n° 10(7) (2006): 645-656.
101. Lavin MJ, Wormald RP, Migdal CS, Hitchings RA. «The influence of prior therapy on the success of trabeculectomy.» *Arch Ophthalmol* 108, n° 11 (Nov 1990): 1543-8.

102. Lee PP, Walt JG, Doyle JJ, Kotak SV, Evans SJ, Budenz DL, Chen PP, Coleman AL, Feldman RM, Jampel HD, Katz LJ, Mills RP, Myers JS, Noecker RJ, Piltz-Seymour JR, Ritch RR, Schacknow PN, Serle JB, Trick GL. «A multicenter, retrospective pilot study of resource use and cost associated with a severity of disease in glaucoma.» *Arch Ophthalmol* 124 (2006): 701-713.
103. Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D, et al. «Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium.» *J Biotechnol* 25, n° 3 (Sep 1992): 231-243.
104. Lewis RA, Katz GJ, Weiss MJ, Landry TA, Dickerson JE, James JE, Hua SY, Sullivan EK, Montgomery DB, Wells DT, Bergamini MV, Travoprost BAC-free Study Group. «Travoprost 0.004% with and without benzalkonium chloride: a comparison of safety and efficacy.» *J Glaucoma* 16, n° 1 (Jan 2007): 98-103.
105. Lichter PR, Musch DC, Gillespie BW, Guire KE, Janz NK, Wren PA, Mills RP, Group CIGTS Study. «Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery.» *Ophthalmology* 108, n° 11 (Nov 2001): 1943-53.
106. Lippa EA. *Carbonic anhydrase inhibitors*. ST. Louis: Mosby, 1996.
107. Madrid JA, Roll FJ, Furthmayr H, Foidart JM. «Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membrane of the murine kidney.» *J Cell Biol* 86 (1980): 682.
108. Mantelli F, Tranchina L, Lambiase A, Bonini S. «Ocular surface damage by ophthalmic compounds.» *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 11, n° 5 (Oct 2011): 467-70.
109. Martínez A, Slof J. «Cost-efficacy analysis of fixed combinations of prostaglandin/prostamide for treating glaucoma.» *Arch Soc Esp Oftalmol* 83, n° 10 (Oct 2008): 595-600.
110. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Carriel V, Scionti G, Alaminos M. «Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures.» *Cytotherapy* 16, n° 2 (Feb 2014): 266-77.
111. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Sanchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. «Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering.» *Cytotherapy* 15, n° 4 (Apr 2013): 507-18.
112. Martus P, Stroux A, Budde WM, Mardin CY, Korth M, Jona JB. «Predictive factors for progressive optic nerve damage in various types of chronic open-angle glaucoma.» *Am J Ophthalmol* 139 (Jun 2005): 999-1009.
113. Maurice DM. «Drug Delivery to the Posterior Segment from Drops.» *Surv Ophthalmol* 47, n° Suppl 1 (Aug 2002): S41-52.

114. McGlynn MM, Ehrlich JR, Marlow ED, Chee RI, Silva FQ, Van Tassel SH, Radcliffe NM. «Association of blood and ocular perfusion pressure with structural glaucomatous progression by flicker chronoscopy.» *Br J Ophthalmol*, Sep 2013.
115. Michee S, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Rostene W, Baudouin C, Labbe A. «Effects of benzalkonium chloride on THP-1 differentiated macrophages in vitro.» *Plos One* 8 (2013).
116. Mietz H, Krieglstein NU. «The effect of preservatives and antiglaucomatous medication on the histopathology of the conjunctiva." .» *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232 (1994): 561-565.
117. Mietz H, Lemke JH, Krieglstein GK. «Early conjunctival changes following treatment with metipranolol and preservatives are not reversible with dexamethasone.» *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 (1997): 452-459.
118. Millin JA, Golub BM, Foster CS. «Human basement membrane components of keratoconus and normal corneas.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 (1986): 604.
119. Moreno M, Villena A, Cabarga C, Sanchez-Font E, Garcia-Campos J. «Impression cytology of the conjunctival epithelium after antiglaucomatous treatment with latanoprost.» *Eur J Ophthalmol* 13, nº 6 (Jul 2003): 553-9.
120. Morrison JC, Pollack IP. *Glaucoma: a clinical guide*. New York: Thieme, 2003.
121. Mosmann T. «Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.» *J Immunol Methods* 65, nº 1-2 (1983): 55-63.
122. Najafi L, Malek M, Valojerdi AE, Khamseh ME, Aghaei H. «Dry eye disease in type 2 diabetes mellitus; comparison of the tear osmolarity test with other common diagnostic tests: a diagnostic accuracy study using STARD standard.» *J Diabetes Metab Disord* 14, nº 59 (Apr 2015): doi: 10.1186/s40200-015-0157-.
123. Nanglia V, Jonas JB, Matin A, Bhojwani K, Sinha A, Kulkarni M, Gupta R, Khare A, Agarwal S, Bhate K, Nangia P, Panda-Jonas S. «Prevalence and associated factors of glaucoma in rural central India. The Central India Eye and Medical Study.» *PLoS One* 8, nº 9 (Sep 2013): e766434.
124. Niwano Y, Iwasawa A, Ayaki M. «Ocular surface cytotoxicity and safety evaluation of tafluprost, a recently developed anti-glaucoma prostaglandin analog.» *Ophthalmol Eye Dis* 13, nº 6 (Feb 2014): 5-12.
125. Noecker RJ, Herrygers LA, Anwaruddin R. «Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications.» *Cornea* 23, nº 5 (2004): 490-496.
126. Okumura Y, Yuki K, Tsubota K. «Low diastolic blood pressure is associated with the progression of normal-tension glaucoma.» *Ophthalmologica* 228 (2012): 36-41.

127. Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, González-Andrades M, Pérez Mdel M, Alaminos M, Campos A. «Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering.» *PLoS One* 8, nº 6 (Jun 2013): e66538. doi: 10.1371/journal.pone.0066538. Print 2013.
128. Oliveira AC, Rodríguez IÁ, Garzón I, Martín-Piedra MÁ, Alfonso-Rodríguez CA, García JM, Sánchez-Quevedo Mdel C, Alaminos M. «An early and late cytotoxicity evaluation of lidocaine on human oral mucosa fibroblasts.» *Exp Biol Med (Maywood)* 239, nº 1 (Jan 2014): 71-82.
129. Owsley C, McGwin G, Ball K. «Vision impairment, eye disease, and injurious motor vehicle crashes in the elderly.» *Ophthalmic Epidemiol*, 1998: 101-113.
130. Pauly A, Roubex C, Liang H, Brignole-Baudouin F, Baudouin C. «In vitro and in vivo comparative toxicological study of a new preservative-free latanoprost formulation.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13, nº 53 (2012): 8172-80.
131. Pellinen P, Huhtala A, Tolonen A, Lökkila J, Mäenpää J, Uusitalo H. «The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium in vitro and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues in vivo. .» *Curr Eye Res* 37, nº 2 (Feb 2012): 145-154.
132. Pellinen PL, Lökkila J. «Corneal penetration into rabbit aqueous humor is comparable between preserved and preservative-free tafluprost.» *Ophthalmic. Res* 41 (2009): 118-122.
133. Perea, José. *Estrabismos*. Toledo: Artes Gráficas 2006.
134. Pinheiro R, Panfil C, Schrage N, Dutescu RM. «The Impact of Glaucoma Medications on Corneal Wound Healing.» *J Glaucoma* 10 (Jul 2015): [Epub ahead of print] .
135. Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignoles F, Baudouin C. «Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex-vivo and in-vitro study.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (2004): 1360-1368.
136. Pisella PJ, Elena PP, Debbasch C, Baudouin C. «Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulation of timolol on the ocular surface of albino rabbits.» *Ophthalmic. Res* 32 (2000): 2-8.
137. Pisella PJ, Poulighen P, Baudouin C. «Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication.» *Br J Ophthalmol* 86, nº 4 (Apr 2002): 418-23.
138. Poulighen Y, Faure JP, Bisson J, Offret G. «The subepithelial acellular fibrillar zone of the cornea of the embryo. Its relation to the formation of the epithelial basal membrane and Bowman's membrane.» *Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol* 26 (1966): 59-68.

139. Prakash G, Agarwal A, Mazhari AI, Chari M, Kumar DA, Kumar G, Singh B. «Reliability and reproducibility of assessment of corneal epithelial thickness by fourier domain optical coherence tomography.» *Invest Ophthalmol Vis Sci*, nº 53(6) (May 2012): 2580-5.
140. Puell Marín, MC. *Óptica Fisiológica: el ojo como sistema óptico y la visión binocular*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2006.
141. Quantock AJ, Young RD. «Development of the corneal stroma, and the collagen-proteoglycan associations that help define its structure and function.» *Dev Dyn*. 237, nº 10 (Oct 2008): 2607-21.
142. Quigley HA, Jampel HD. «How are glaucoma patients identified?» *J Glaucoma* 12, nº 6 (Dec 2003): 451-455.
143. Quigley HA, B. A. «The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020.» *Br J Ophthalmol* 90 (2006): 262-267.
144. Rabinovich-Guillat L, Couvreur P, Lambert G, Dubernet C. «Cationic vectors in ocular drug delivery.» *J Drug Target* 12 (2004): 623-633.
145. Rodríguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, Campos A. «Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells.» *Ann Vasc Surg* 22, nº 3 (May-Jun 2008): 440-8.
146. Romanelli L, Valeri, P., Morrone, L. A., Pimpinella, G, Graziani, G. and Tita, B. «Ocular absorption and distribution of bendazac after topical administration to rabbits with different vehicles.» *Life Sci*. 54, nº 13 (1994): 877-885.
147. Sadler TW. *Langman: Embriología Médica con orientación clínica*. Madrid: Panamericana, 2007.
148. Samples JR, Binder PS, Nayak S. «The effect of epinephrine and benzalkonium chloride on cultured corneal endothelial and trabecular meshwork cells.» *Exp Eye Res* 49 (1989): 1-12.
149. Schmidl D, Schmetterer L, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A. *J Ocul Pharmacol Ther* 31, nº 2 (Mar 2015): 63-67.
150. Seah SKL, Foster PJ, Chew PTK, Jap A, Oen F, Fam HB, Lim ASM. «Incidence of acute primary angle-closure glaucoma in Singapore; an island-wide survey.» *Arch Ophthalmol* 115 (1997): 1426-1440.
151. Senutovitch N, Verneti L, Boltz R, DeBiasio R, Gough A, Taylor DL. «Fluorescent protein biosensors applied to microphysiological systems.» *Exp Biol Med (Maywood)* 240, nº 6 (2015): 795-808.
152. Sevel Disaacs R. «A re-evaluation of corneal development.» *Trans Am Ophthalmol Soc* 86 (1988): 178-207.

153. Shuttleworth CA. «Type VIII collagen.» *Int J Biochem Cell Biol* 29, nº 10 (Oct 1997): 1145-8.
154. Sjöquist B, Basu S, Byding P, Bergh K, Stjernschantz J. «The pharmacokinetics of a new antiglaucoma drug, latanoprost, in the rabbit.» *Drug Metab Dispos* 26, nº 8 (Aug 1998): 745-754.
155. Smedowski A, Paterno JJ, Toropainen E, Sinha D, Wylegala E, Kaarniranta K. «Excipients of preservative-free latanoprost induced inflammatory response and cytotoxicity in immortalized human HCE-2 corneal epithelial cells.» *J Biochem Pharmacol Res* 2, nº 4 (Dec 2014): 175-184.
156. Spalton DJ, Hitchings RA, Hunter PA. *Atlas de Oftalmología Clínica*. Madrid: Elsevier, 2006.
157. Spittel H, Kubek F, Kreskowski K, Ziegler M, Klein E, Hamid AB, Kosyakova N, Radhakrishnan G, Junge A, Kozlowski P, Schulze B, Martin T, Huhle D, Mehnert K, Rodríguez L, Ergun MA, Sarri C, Militaru M, Stipoljev F, Tittelbach H, Vasheghani F, de Bello Cioffi M, Hussein SS, Fan X, Volleth M, Liehr T. «Mitotic stability of small supernumerary marker chromosomes: a study based on 93 immortalized cell line.» *Cytogenet Genome Res* 142, nº 3 (2014): 151-60.
158. Stalmans I, Sunaric Mégevand G, Cordeiro MF, Hommer A, Rossetti L, Goñi F, Heijl A, Bron A. *Eur J Ophthalmol* 23, nº 4 (Jul-Aug 2013): 518-25.
159. Stamper RL, Wigginton SA, Higginbotham EJ. «Primary drug treatment for glaucoma: beta-blockers versus other medications.» *Surv Ophthalmol* 47, nº 1 (Jan-Feb 2002): 63-73.
160. Sumantran VN. «Cellular chemosensitivity assays: an overview.» *Methods Mol Biol* 731 (2011): 219-36.
161. Swymer C, Neville MW. «Tafluprost: the first preservative-free prostaglandin to treat open-angle glaucoma and ocular hypertension.» *Ann Pharmacother* 46, nº 11 (Nov 2012): 1506-10.
162. Tabet R, Stewart WC, Feldman R, Konstas AG. «A review of additivity to prostaglandin analogs: fixed and unfixed combinations.» *Surv Ophthalmol* 53, nº Suppl1 (Nov 2008): S85-92.
163. Tan S, Yu M, Baig N, Chan PP, Tang FY, Tham CC. «Circadian Intraocular Pressure Fluctuation and Disease Progression in Primary Angle Closure Glaucoma.» *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56, nº 8 (Jul 2015): 4994-5005.
164. Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Suganami H, Araie M, Group K-115 Clinical Study. «Additive Intraocular Pressure-Lowering Effects of the Rho Kinase Inhibitor Ripasudil (K-115) Combined With Timolol or Latanoprost: A Report of 2 Randomized Clinical Trials.» *JAMA Ophthalmol* 133, nº 7 (Jul 2015): 755-61.
165. Tanna AP, Lin AB. «Medical therapy for glaucoma: what to add after a prostaglandin analogs?» *Curr Opin Ophthalmol* 26, nº 2 (Mar 2015): 116-20.

166. Terai N, Schlötzer-Schrehardt U, Lampel J, Böhm AG, Rummelt C, Schmidt E, Pillunat LE. «Effect of latanoprost and timolol on the histopathology of the human conjunctiva.» *Br J Ophthalmol* 93, nº 2 (Feb 2009): 219-24.
167. The Glaucoma Laser Trial (GLT). «Treatment group differences in visual field changes.» *American Journal of Ophthalmology* 120, nº 1 (1995): 10-22.
168. Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J. «Racial variation in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey.» *JAMA* 266 (1991): 369-374.
169. Tomlinson A, Leighton DA. «Ocular dimensions in the heredity of angle-closure glaucoma Br J Ophthalmol.» 57 (1973): 475-486.
170. Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, Ikegami T, Ishiyama M, Ezo T, Matsumoto K. «Rapid susceptibility testing for slowly growing nontuberculous mycobacteria using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium WST-1.» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Jul 2015: [Epub ahead of print].
171. Tuulonen A, Airaksinen PJ, Erola E, Forsman E, Friberg K, Kaila M, Klemetti A, Mäkelä M, Oskala P, Puska P, Suoranta L, Teir H, Uusitalo H, Vainio-Jylhä E, Vuori ML. «The Finnish evidence-based guideline for open angle glaucoma.» *Acta Ophthalmol Scand* 81 (2003): 3-18.
172. Uematsu M, Mohamed YH, Onizuka N, Ueki R, Inoue D, Fujikawa A, Sasaki H, Kitaoka T. «Acute corneal toxicity of latanoprost with different preservatives.» *Cutan Ocul Toxicol*, nº 26 (Jun 2015): 1-6 [Epub ahead of print].
173. Van de Velde S, De Groef L, Stalmans I, Moons L, Van Hove I. «Towards axonal regeneration and neuroprotection in glaucoma: Rho kinase inhibitors as promising therapeutics.» *Prog Neurobiol*, Jun 2015: Epub ahead of print].
174. Vico M, Rodríguez-Morata A, Garzón I, Campos F, Jaimes-Parra B, Pérez-Köhler B, Buján J, Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC. «Cell viability evaluation of transdifferentiated endothelial-like cells by quantitative electron-probe X-ray microanalysis for tissue engineering.» *Histol Histopathol* 30, nº 11 (Nov 2015): 133-40.
175. Vinay M, Franche N, Grégori G, Fantino JR, Pouillot F, Ansaldi M. «Phage-Based Fluorescent Biosensor Prototypes to Specifically Detect Enteric Bacteria Such as E. coli and Salmonella enterica Typhimurium.» *PLoS One* 10, nº 7 (Jul 2015): e0131466. doi
176. Waisbourd M, Parker S, Ekici F, Martinez P, Murphy R, Scully K, Wizov SS, Hark LA, Spaeth GL. «A prospective, longitudinal, observational cohort study examining how glaucoma affects quality of life and visually-related function over 4 years: design and methodology.» *BMC Ophthalmol* 15, nº 1 (Aug 2015): 91.

177. Wang YQ, Wang X, Liu P. «Meta analysis about the efficacy and safety of anti-ocular hypertension eye drops without benzalkonium chloride.» *Asian Pac J Trop Med.* 2013 Dec;6(12) 6, nº 12 (Dec 2013): 1004-8.
178. Weinreb RN, Levin LA. «Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma?» *Arch Ophthalmol* 117, nº 11 (Nov 1999): 1540-4.
179. Wilson MR, Hertzmark E, Walker AM, Child-Shaw K, Epstein DL. «A case control study of risk factors in open angle glaucoma.» *Arch Ophthalmol* 105 (1987): 1066-71.
180. Wilson SE, Hong Jong-Wook. «Bowman's layer structure and function. Critical or dispensable corneal function? A hypothesis.» *Cornea* 19, nº 4 (2000): 417-420.
181. Wilson WS, Jay JL. «Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man.» *Br J Ophthalmol* 59 (1975): 667-669.
182. Woodward DF, Wang JW, Poloso NJ. «Recent progress in prostaglandin F2 α ethanolamide (prostanamide F2 α) research and therapeutics.» *Pharmacol Rev* 65, nº 4 (Jul 2013): 1135-47.
183. Yeh TN, Graham AD, Lin MC. «Relationships among Tear Film Stability, Osmolarity, and Dryness Symptoms.» *Optom Vis Sci* 3 (Jul 2015): [Epub ahead of print].