

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)

GRUPO DE SUPERFICIE OCULAR



***“Influencia del tratamiento tópico prolongado  
con brimonidina versus la asociación  
brimonidina y timolol en indicadores de  
inflamación conjuntival de pacientes con  
glaucoma”***

Trabajo de investigación presentado por la licenciada Sonia Villarón Álvarez  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid en el área de Oftalmología

## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

D. José M<sup>a</sup> Herreras Cantalapiedra, profesor del departamento de Cirugía, Oftalmología y Otorrinolaringología y Fisioterapia, Facultad de Medicina

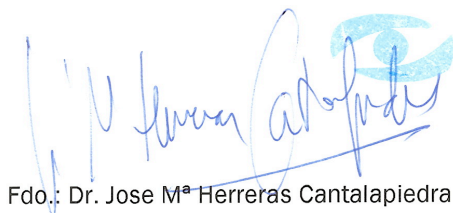
D. Alfredo Corell Almuzara, profesor del departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia-Ginecología, Nutrición-Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia, Facultad de Medicina

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada *“Influencia del tratamiento tópico prolongado con brimonidina versus la asociación brimonidina y timolol en indicadores de inflamación conjuntival de pacientes con glaucoma”* presentada por D<sup>a</sup>. Sonia Villarón Álvarez alumna del programa de Doctorado en Ciencias de la Visión impartido por el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid,


AUTORIZAN la presentación de la misma, considerando que cumple los requisitos de originalidad y relevancia del tema estudiado y tiene suficiente calidad en cuanto al desarrollo y elaboración de la memoria científica.

Valladolid 10 de julio de 2013

Los Directores de la Tesis,



Fdo.: Dr. Jose M<sup>a</sup> Herreras Cantalapiedra



Fdo: Dr. Alfredo Corell Almuzara

**ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORAD**



# AGRADECIMIENTOS

Al Doctor José María Herreras Cantalapiedra, codirector de esta tesis, por su apoyo continuo, dedicación y esfuerzo durante estos años para que esta tesis saliera adelante.

Al Doctor Alfredo Corell Almuzara, codirector de esta tesis, por su paciencia, dedicación, esfuerzo y sus enseñanzas en el mundo de la inmunología ocular.

Al Doctor Roberto Reinoso, por su paciencia y constante aporte en la caracterización celular por citometría de flujo.

A todos los componentes del laboratorio y del Grupo de Superficie Ocular del IOBA, por su colaboración, tiempo y dedicación a esta tesis.

A Itziar Fernández Martínez por todo su tiempo y dedicación con el análisis estadístico.

A todos los pacientes que sirvieron como donantes.

A todos aquellos que, de alguna manera, colaboraron en todas las fases de desarrollo de esta tesis; toda ella es el fruto de un trabajo en equipo, en especial del Grupo de Superficie Ocular del IOBA.

A mis padres por su ejemplo, amor y apoyo, ya que lo que soy ahora es el fruto de su esfuerzo y dedicación.

A toda mi familia, y especialmente a los que ya no están.

Finalmente, al Profesor Pastor por su empeño en la necesidad constante de seguir investigando por y para la oftalmología.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	8
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>2.A. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	
<b>2.A.1. Justificación</b> .....	11
<b>2.A.2. Hipótesis</b> .....	13
<b>2.A.3. Objetivos</b> .....	14
<b>2.B. ESTADO ACTUAL DEL TEMA</b>	
<b>2.B.1. Sistema Nervioso Autónomo</b>	
<b>2.B.1.1. Receptores Alfa adrenérgicos</b> .....	15
<b>2.B.1.2. Fármacos Alfa-agonistas. Brimonidina</b> .....	19
<b>2.B.1.3. Receptores Beta adrenérgicos</b> .....	20
<b>2.B.1.4. Fármacos Beta-Bloqueantes</b> .....	21
<b>2.B.2. Unidad Funcional Lagrimal</b>	
<b>2.B.2.1. Concepto</b> .....	22
<b>2.B.2.2. Epitelio corneo-conjuntival</b> .....	23
<b>2.B.2.3. Película lagrimal</b> .....	26
<b>2.B.2.4. Mucinas</b> .....	32
<b>2.B.3. Citocinas y quimiocinas</b> .....	34
<b>2.B.4. Sistema Inmunitario de la mucosa ocular</b> .....	41
<b>2.B.4.1. Tejido linfoide asociado a la conjuntiva</b> .....	42
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	45
<b>3.A. DISEÑO DEL ESTUDIO</b> .....	46
<b>3.A.1 SUJETOS</b> .....	46
<b>3.A.2 SECUENCIA DE LA EXPLORACIÓN</b> .....	48
<b>3.A.3 PAUTA DE VISITAS</b> .....	49
<b>3.A.3.1. Visita 0. Selección de los sujetos</b>	
<b>3.A.3.2 Visitas 1- 4. Seguimiento de los sujetos</b>	

### **3.B. PRUEBAS REALIZADAS**

#### **3.B.1. Variables Clínicas**

<b>3.B.1.A. Historia Clínica Personal</b> .....	50
<b>3.B.1.B. Encuesta clínica estandarizada: <i>Symptoms of discomfort questionnaire (Allergan protocol)</i></b> .....	51
<b>3.B.1.C. Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo (NIBUT)</b> .....	51
<b>3.B.1.D. Test de Schirmer con anestesia</b> .....	51
<b>3.B.1.E. Biomicroscopía de polo anterior. Tinciones con fluoresceína y rosa de Bengala</b> .....	52
<b>3.B.1.F. Toma de tensión intraocular (PIO)</b> .....	54

#### **3.B.2. Variables de Laboratorio**

<b>3.B.2.A. Determinación de la concentración de lisozima lagrimal</b> .....	54
-Toma de la muestra	
-Cuantificación de la concentración de lisozima lagrimal	
<b>3.B.2.B. Citología por impresión conjuntival</b>	
<b>3.B.2.B.1. Citología por impresión conjuntival para microscopía óptica</b> .....	56
-Toma de la muestra	
-Tinción PAS-Papanicolau	
-Cuantificación mediante Estadaje de Nelson	
<b>3.B.2.B.2. Citología por impresión conjuntival para cuantificación de genes de receptores alfa-2 adrenérgicos</b> .....	59
-Toma de la muestra	
-Aislamiento del ARN	
-Cuantificación del ARN	
-Síntesis de ADN complementario	
-Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RT-PCR)	
<b>3.B.2.C. Citocinas y quimiocinas</b> .....	64
- Toma de la muestra	
- Análisis de la muestra	

3.B.2.D. Análisis de las células de la Superficie Ocular mediante citometría de flujo .....	64
-Toma de la muestra mediante cepillado o <i>brush</i> conjuntival	
-Caracterización de la población celular obtenida mediante citometría de Flujo	
-Anticuerpos y marcadores usados en la citometría de flujo	
-Cuantificación del linaje celular-estudio fenotípico	
-Cuantificación de la viabilidad celular-estudio apoptosis	
-Cuantificación del ciclo celular-estudio contenido ADN	
3.C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	68

## 4. RESULTADOS

4.A. GRUPOS MUESTRALES .....	70
4.B. RESULTADOS DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS	
4.B.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS .....	72
4.B.2. VARIABLES CLÍNICAS .....	73
4.B.3. VARIABLES LABORATORIO .....	80

## 5. DISCUSIÓN

5.A. GRUPOS MUESTRALES. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....	112
5.B. VARIABLES CLÍNICAS	
5.B.1. Encuesta clínica estandarizada: <i>Symptoms of dyscomfort questionnaire (Allergan protocol)</i> .....	113
5.B.2. NIBUT .....	114
5.B.3. Test de Schirmer con anestesia .....	115
5.B.4. Tinción con fluoresceína. Escala de Oxford .....	115
5.B.5. Tinción con rosa de Bengala. Escala de Van Bijstervald .....	116
5.B.6. PIO .....	116
5.C. VARIABLES DE LABORATORIO	
5.C.1. Lisozima lagrimal .....	117

<b>5.C.2. CIC por Impresión Conjuntival</b>	
<b>5.C.2.1. CIC para Microscopía Óptica. Estadiaje de Nelson</b>	118
<b>5.C.2.2. CIC para Cuantificación de genes de receptores alfa-2</b>	
<b>adrenérgicos</b>	119
<b>5.C.3. Citocinas y quimiocinas</b>	121
<b>5.C.4. Técnicas mínimamente invasivas. <i>Brush</i> conjuntival. Caracterización</b>	
<b>celular por citometría de flujo</b>	122
<b>5.C.4.1. Fenotipo de IELs</b>	
<b>5.C.4.2. Viabilidad</b>	
<b>5.C.4.3. Ciclo celular</b>	
<b>6. CONCLUSIONES</b>	127
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	131
<b>8. ABREVIATURAS</b>	136
<b>ANEXO</b>	
<b>I- SECUENCIA DE EXPLORACIÓN</b>	139
<b>II- CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	142





# 1. RESUMEN

Un 3% de la población mayor de 60 años precisa tratamiento anti-glaucomatoso tópico por presentar hipertensión ocular. Uno de los grupos de fármacos más útiles son los agonistas de los receptores adrenérgicos alfa-2, y en concreto, la brimonidina. Pero se ha observado que hasta un 20% de los pacientes tratados desarrolla procesos inflamatorios de la superficie ocular muy severos que obligan a retirar el tratamiento. Este fenómeno podría estar mediado por la activación de los receptores adrenérgicos alfa-2, presentes en las células de la conjuntiva. Nuestra hipótesis es que estos procesos inflamatorios -secundarios al tratamiento tópico- podrían evitarse con la asociación de un beta-bloqueante (como el timolol), lo que además potenciaría el efecto hipotensor del fármaco.

Para demostrar esta hipótesis, se han estudiado dos grupos de pacientes que precisaron tratamiento hipotensor ocular; se les administró brimonidina o la combinación de brimonidina con timolol antes de iniciar el tratamiento tópico, así como tras 3, 6, 9 y 12 meses y se verificó la presión intraocular de los pacientes como respuesta a las dos terapias; además se realizó una valoración subjetiva de síntomas de inflamación de la superficie ocular, una exploración clínica que incluyó: a) la medida del tiempo de ruptura de la película lagrimal, b) tinciones con fluoresceína y rosa de Bengala, c) test de Schirmer con anestesia tópica conjuntival; a los mismos tiempos se determinó en el laboratorio: a) la concentración de lisozima lagrimal, b) tinción con PAS y evaluación por microscopio óptico sobre citologías por impresión conjuntival c) se cuantificaron la viabilidad, ciclo celular y linfocitos intraepiteliales de las de los tejidos conjuntivales mediante citometría de flujo en muestras obtenidas mediante citología por cepillado. Además, antes de iniciar el tratamiento, y al finalizar el mismo (12 meses) se cuantificaron los genes de los receptores adrenérgicos alfa-2 mediante PCR a tiempo real en muestras de citología por impresión conjuntival.

Los resultados obtenidos nos permitieron observar: a) que la asociación del betabloqueante con el agonista de los receptores adrenérgicos alfa-2 ayudo a disminuir la presión intraocular de forma mas intensa en periodos cortos de tiempo; b) no hay buenas correlaciones entre indicadores subjetivos (cuestionarios) de daño en la superficie con las pruebas funcionales clásicas que se utilizan en la práctica clínica; c) los biomarcadores moleculares o celulares de la superficie ocular, estudiados mediante técnicas de biología molecular y citometría de flujo pueden ser muy útiles para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes; d) el uso prolongado de ambos fármacos induce procesos inflamatorios (que se asemejan a un ojo seco secundario) en la superficie ocular de los pacientes, si bien parece menos lesivo y tóxico a corto y medio plazo el preparado que incluye los 2 fármacos (brimonidina y timolol).



## 2. INTRODUCCIÓN

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.A. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **2.A.1. JUSTIFICACIÓN**

Se define como neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) a un grupo de enfermedades oculares que conllevan a una degeneración del nervio óptico, expresada, ésta, en forma de una afectación estructural de la cabeza del nervio óptico o en una alteración del campo visual.

Existen muchas formas clínicas de NOG, entre las que se incluyen el glaucoma crónico simple de ángulo abierto, el glaucoma crónico de ángulo cerrado, el glaucoma del afáquico, el glaucoma inflamatorio, y ciertos procesos específicos como son el glaucoma secundario al síndrome de pseudoexfoliación o al síndrome de dispersión pigmentaria.

En la actualidad se reconocen varios factores de riesgo para el desarrollo de una NOG, pero sin duda alguna, el más importante de todos ellos es la presencia de una tensión ocular por encima de 22 mm Hg. (1)

Otra situación, también frecuente en la práctica clínica del oftalmólogo, es lo que se conoce como Hipertensión ocular (HTO), definida como la existencia de una tensión ocular por encima de 22 mm Hg, pero que a diferencia de la NOG, cursa sin alteraciones estructurales en la cabeza del nervio óptico ni en el campo visual.(1) El principal problema de esta patología es que hasta un 9,5% de los pacientes hipertensos oculares que permanezcan sin tratamiento hipotensor, acabarán desarrollando una NOG a los cinco años. (1)

A día de hoy el objetivo terapéutico de elección, capaz de ofrecer los mejores resultados, tanto en los pacientes hipertensos oculares, como en los que ya han desarrollado una NOG, consiste en disminuir la presión intraocular.

Las implicaciones socio-sanitarias de iniciar este tipo de abordaje terapéutico son evidentes, ya que si a los pacientes con una NOG desarrollada se suman los pacientes hipertensos oculares que precisarían tratamiento hipotensor, es decir, aquellos pacientes hipertensos oculares con paquimetría menor de 520 micras, aumento de la excavación papilar, presión intraocular superior a 28 mm Hg, edad mayor de 60 años y síndrome de pseudoexfoliación, se calcula que hasta un 3% de la población mayor de 60 años va a precisar tratamiento médico para disminuir la tensión ocular.(1)

El tratamiento hipotensor ocular más empleado se administra por vía tópica conjuntival. (2) Existen varios fármacos, entre los que se incluyen los agentes colinérgicos, los beta-bloqueantes, los inhibidores de la anhidrasa carbónica, las prostaglandinas, las prostamidas, y los fármacos alfa-2 agonistas. Dentro de estos últimos, el más importante, por su eficacia, es la brimonidina.(2)

La brimonidina es un fármaco habitual en el armamento terapéutico del oftalmólogo, ya que proporciona una potencia hipotensora muy elevada, con muy pocos efectos secundarios y/o adversos a nivel sistémico, lo que hace de ella una sustancia muy segura. Sin embargo, se calcula que hasta un 20% de los pacientes con este tratamiento desarrollan cuadros locales de inflamación de la superficie ocular que obligan, en la mayoría de los casos, a abandonar el tratamiento. (2)

El grupo de trabajo de Superficie Ocular del IOBA ha conseguido demostrar en células conjuntivales normales en cultivo la expresión de receptores adrenérgicos alfa, en concreto, alfa-2A, alfa-2B y alfa-2C.(3,4)

Este mismo grupo ha demostrado, también, que estos receptores se sobre expresan, en dichas células conjuntivales, cuando éstas se incuban con citocinas proinflamatorias como el Interferón o el TNF alfa. Este dato plantea la posibilidad de que los receptores adrenérgicos puedan jugar un papel importante en los fenómenos inflamatorios de la conjuntiva.(3,4)

En este mismo sentido, el Grupo de Superficie Ocular del IOBA ha estudiado, a través de técnicas de citometría de flujo, la distribución y caracterización de las células epiteliales y de los linfocitos intraepiteliales en la mucosa ocular humana sana consiguiendo demostrar la existencia de una población linfoide con capacidad de respuesta inflamatoria en dichos sujetos sanos;(5) por lo que parece lógico pensar que dicha población linfoide se vera modificada en aquellos sujetos tratados con fármacos tópicos. El análisis de esta población linfoide nos puede proporcionar una medida directa del grado de inflamación, dato que nos puede ayudar a comprender otra de las posibles piezas del mecanismo de acción involucrado en estas reacciones inflamatorias/ alergiformes.

Por lo tanto, parece lógico pensar que tanto la sobreexpresión de receptores alfa-adrenérgicos como la alteración en la respuesta linfoide de la superficie ocular puedan ser alguno de los mecanismos fisiopatológicos, que explicarían la aparición de fenómenos inflamatorios/ alergiformes en pacientes tratados con fármacos alfa-2 agonistas, como la brimonidina, y que obligan al oftalmólogo a retirar el tratamiento hasta en un 20% de los casos, como ya se ha comentado con anterioridad.

En base a estos mismos mecanismos fisiopatológicos estudiados, se podría plantear la posibilidad de que, en estos casos, si se tratase a este 20% de paciente con una asociación brimonidina y un agente beta-bloqueante; esta combinación terapéutica, además de potenciar el efecto hipotensor de la brimonidina, podría modular la aparición, frecuencia e intensidad de dichos episodios inflamatorios/alergiformes. (6,7)

## **2.A.2. HIPÓTESIS**

El uso prolongado de tratamiento tópico antiglaucomatoso puede inducir un incremento objetivo de los signos, síntomas e indicadores inflamatorios de la superficie ocular, como el número y tipo de linfocitos intraepiteliales (IELs) y/o la expresión de citocinas proinflamatorias.

La expresión de receptores alfa-2 adrenérgicos conjuntivales, involucrados en estos fenómenos inflamatorios de la superficie ocular se modulada mediante el uso de medicación tópica conjuntival, en concreto alfa 2-agonistas.

Nuestra hipótesis es que: “la asociación de un fármaco beta-bloqueante al alfa-2-agonista puede reducir la ocurrencia y/o intensidad de estos episodios inflamatorios no deseables.

## 2.A.3. OBJETIVOS

**Objetivo general:** estudiar los efectos en la superficie ocular de pacientes con glaucoma tras tratamiento prolongado con agentes hipotensores (brimonidina vs brimonidina más timolol); valorando con especial interés, y a diferentes plazos post-tratamiento, la aparición de indicadores de inflamación ocular secundarios al uso de los fármacos, tanto clínicos como de laboratorio.

De este propósito principal se desprenden los siguientes **objetivos específicos:**

1-Aleatorización de pacientes diagnosticados de hipertensión ocular y sin tratamiento previo en 2 grupos: el primer grupo, GI, será tratado tópicamente con un preparado comercial de alfa-2-agonistas (Alphagan®) y el segundo grupo, GII, será tratado tópicamente con un preparado comercial de alfa-2-agonistas más beta-bloqueante (Combigan®)

2- Estudio de los pacientes antes de comenzar el tratamiento y a los 3, 6, 9 y 12 meses de iniciarlo para establecer si hay diferencias a corto, medio o largo plazo.

3.- En cada uno de estos puntos de control se tomará la presión intraocular para valorar la efectividad de ambos fármacos, y se determinarán los siguientes indicadores clínicos de inflamación conjuntival:

- Encuesta clínica estandarizada “*Symptoms of discomfort questionnaire (Allergan Protocol)*”
- Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo
- Test de Schirmer con anestesia
- Escalas de Oxford y Van Bijstervald

4.-En cada uno de los puntos de control se tomarán las siguientes muestras a fin de confirmar la utilidad de dichas técnicas en la práctica clínica, y con las que se realizará la determinación de indicadores de laboratorio de inflamación conjuntival :

- Toma de Citología por Impresión para:
  - Determinación de lisozima lagrimal
  - Expresión de genes alfa-2-adrenérgicos
  - Tinción PAS-Papanicolau para estadiaje de Nelson
- Toma de Lágrima para analizar:
  - Citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias
- Citología por Cepillado para analizar:
  - Viabilidad de las células conjuntivales, ciclo celular y linfocitos intraepiteliales

## **2.B. ESTADO ACTUAL DEL TEMA**

### ***2.B.1. Sistema Nervioso Autónomo***

#### ***2.B.1.1. Receptores Alfa adrenérgicos***

El ser humano para el desarrollo de su vida cotidiana requiere de una constante interrelación con el medio ambiente que le rodea, función para la cual dispone de tres grandes sistemas o medios, el sistema nervioso (SN), el sistema endocrino y el sistema inmunitario; entre los mediadores de los tres sistemas existe interrelación, siendo los neurotransmisores los mediadores del SNC, las hormonas los del sistema endocrino y las citocinas los del sistema inmunitario.(8)

El SN, caracterizado por su especial capacidad para recibir y emitir información, se subdivide en dos importantes vías de transmisión de información; la primera de ellas, es la conocida como SN Central (SNC), que controla y regula las funciones motoras del organismo a través de la contracción de los músculos esqueléticos.

Paralelamente, pero en estrecho contacto, se encuentra el SN Autónomo (SNA), que ejerce su influencia de una forma autónoma, es decir, sin requerir control de la conciencia, sobre un gran número de funciones viscerales del organismo como son la presión arterial, la sudoración o la temperatura corporal, entre otras.

Una de las características más llamativas de este sistema, y que lo hace diferente del resto, es su intensidad y rapidez de respuesta ante cualquier estímulo. Estas respuestas autónomas se transmiten a través de dos subunidades principales, el SNA Simpático (SNAS) y el Parasimpático (SNAP).(8)

La mayoría de las señales viscerales, de modo particular el dolor visceral, se transmiten por las aferencias del SNAS; anatómicamente representa hasta el 8% de las fibras de un nervio motor, regulando, así, la función de los vasos sanguíneos, las glándulas sudoríparas o los músculos piloerectores. En cambio, las fibras del SNAP recogen aspectos no sensoriales de las funciones viscerales, como pueden ser la quimio o la barorrecepción, entre otras, y anatómicamente representan hasta el 75% de las fibras de nervios sensitivos como el X par craneal o nervio Vago; o el 25% de otros pares craneales como el III par o Motor Ocular Común, el VII par o Facial o el IX par o Glossofaríngeo, regulando, así, órganos con funciones tan diversas como el corazón, el pulmón, el esófago o el ojo.

Para el correcto funcionamiento de estos sistemas transmisores de información se requiere la presencia de dos neuronas, la pre y la postganglionar, y una correcta comunicación o



sinapsis entre éstas y las sustancias encargadas de transmitir la información o transmisores. Estos transmisores son en su mayor parte moléculas químicas que, a su vez, actúan sobre los distintos órganos efectores provocando una respuesta final o función.

Las fibras nerviosas del SNA, tanto simpáticas como parasimpáticas, pueden secretar uno de los siguientes transmisores, la acetilcolina (Ach) o la adrenalina (Adr). Prácticamente todas las fibras parasimpáticas secretan Ach, denominándolas colinérgicas; por eso, de la Ach se dice que es un transmisor parasimpático o colinérgico; en cambio, las fibras simpáticas, en su mayoría, secretan Adr, denominándolas adrenérgicas, y a sus transmisores simpáticos o adrenérgicos.(9)

Estudios recientes demuestran que existe una interacción, intensa y estrecha, entre el sistema nervioso autónomo, el sistema inmunitario y el sistema endocrino; y que dicha conexión permite establecer un flujo constante desde los nervios periféricos al sistema central; este flujo de neurotransmisores es capaz de modular la actividad de células epiteliales e inflamatorias a través de receptores específicos.(10)

Parece que esta interacción puede jugar un importante papel en la fisiopatología de diversas enfermedades inflamatorias. En concreto, a nivel ocular, se sabe que existen receptores, tanto adrenérgicos como colinérgicos, en el epitelio escamoso no estratificado de la conjuntiva de ratas, ratones y humanos.(3,4)

Es importante conocer estos receptores, ya que el bloqueo de uno u otro suele ser el mecanismo de actuación de algunos fármacos en medicina.

Los **receptores colinérgicos** se subdividen en dos grupos, los *muscarínicos* y los *nicotínicos*. Inicialmente se hizo esta distinción según métodos empíricos farmacológicos, basados en ciertas respuestas a la Ach; así, las respuestas provocadas por la excitación de las fibras preganglionares simpáticas y parasimpáticas, así como las provocadas en la placa motriz por activación de las fibras motoras, eran imitadas por la nicotina y bloqueadas selectivamente por la tubocuranina. En cambio, las respuestas producidas por excitación de las fibras posganglionares parasimpáticas eran imitadas por la muscarina, y bloqueadas selectivamente por la atropina. A los receptores responsables del primer tipo de respuestas se los denominó *nicotínicos*, y a los del segundo tipo, *muscarínicos*. Más tarde, tras los resultados de estudios de fijación de radioligandos y biología molecular, se confirmaron la existencia de dos tipos de receptores cuya estructura, naturaleza y funciones eran distintas; por una parte, estaban los receptores nicotínicos, que presentaban en su estructura un canal iónico receptor dependiente para controlar su apertura. Dentro de estos receptores nicotínicos se diferenciaron dos subtipos de receptores, el Nm o muscular, localizado en la placa motriz y antagonizado de forma específica por la tubocuranina y la alfa

bungarotoxina; y el Nn o neuronal, localizado en el SNC, en ganglios vegetativos y en células cromafines de la médula suprarrenal, y cuyo antagonista más específico es el timetofán. Nuevos estudios de clonación molecular han permitido diferenciar y clasificar las distintas subunidades de estos receptores en dos grandes familias, la familia de la subunidad alfa ( $\alpha$ ), que característicamente contiene los residuos Cys 192 y 193, que son el lugar específico de fijación de la Ach; esta familia está formada por la subunidad  $\alpha 1$  del receptor Nm y las subunidades  $\alpha 2, \alpha 3$  y  $\alpha 4$  del receptor Nn. La segunda familia está compuesta por la subunidad beta ( $\beta$ ), que a diferencia de la anterior, carece de los residuos Cys 192 y 193, y a la que pertenecen la subunidad  $\beta 1$  del receptor Nm y la subunidad  $\beta 2, \beta 3$  y  $\beta 4$  del receptor Nn.(8,9)

Respecto a los *receptores muscarínicos*, morfológicamente, se disponen asociados a proteína G y constan de siete dominios transmembrana mediante los cuales activan sistemas efectores celulares de diverso origen, que incluyen la adenilato ciclasa, los canales de potasio y los canales de calcio.(11) Se han clonado al menos cinco subtipos de receptores muscarínicos denominados como M1 a M5.

Los **receptores adrenérgicos**, por su parte, serían aquellas estructuras que reciben selectivamente las señales de Adr y noradrenalina (NA), transformándolas en una respuesta celular específica. La primera clasificación de estos receptores fue dada por Ahlquist en 1948, que los dividió en dos clases,  $\alpha$  y  $\beta$ , según su respuesta al ser estimulados por tres tipos diferentes de catecolaminas; los  $\alpha$  respondían a la estimulación en el siguiente orden: Adr > NA > isoprenalina, mientras que los  $\beta$  seguían el orden siguiente: isoprenalina > Adr > NA. Posteriormente, se pudo confirmar esta clasificación de una forma más objetiva, tras la aparición de fármacos antagonistas que bloqueaban selectivamente las acciones  $\alpha$ , como son la ergotamina o la fenoxibenzamina, y para las acciones  $\beta$ , entre otros, el propanolol. (8,9)

A su vez, los *receptores  $\alpha$*  se subdividen en  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Los *receptores  $\alpha 1$* , se localizan a nivel de las arteriolas, el músculo dilatador de la pupila y el músculo de Muller; tras su activación producen contracción en el órgano efector, lo que se traduce en hipertensión, midriasis y retracción palpebral respectivamente; son antagonizados selectivamente por la prazosina. Se conocen tres subtipos de receptores  $\alpha 1$ , los  $\alpha 1A, \alpha 1B$  y  $\alpha 1D$ .(12,13)

Los *receptores  $\alpha 2$*  participan en funciones fisiológicas como la nocicepción, la regulación de la presión arterial y los reflejos espinales. En concreto, se sabe que los receptores postsinápticos participan en la contracción del músculo liso, y los receptores presinápticos inhiben la liberación de norepinefrina por las fibras postganglionares simpáticas.(14,15) Su mecanismo de

acción viene determinado por su capacidad de ser activados primariamente por la epinefrina y la norepinefrina; además, pueden ser estimulados selectivamente, entre otros, por la apraclonidina o la brimonidina, que son fármacos empleados frecuentemente como tratamiento para disminuir la presión intraocular. En contra, son selectivamente antagonizados por concentraciones bajas de rauwolscina, yohimbina o idaxozán.(10) Parece que todos ellos, al ser miembros de una familia de receptores asociados a proteína G, responden a las mismas señales, reguladas a través de la vía de la adenilato ciclasa.(11) A partir de estudios llevados a cabo con radioligandos y estudios de clonación funcional y molecular, se han identificado tres subtipos de receptores  $\alpha_2$  que se repiten en los mamíferos. En el caso concreto del ser humano, estos subtipos se conocen como  $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$  y  $\alpha_2C$ , y sus respectivos genes se localizan en los cromosomas 10, 2 y 4.(16-18) El RNA para los tres subtipos de receptores  $\alpha_2$  se expresa en el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y en tejidos periféricos, y se sabe que cada tejido tiene una proporción característica de cada uno de los subtipos de receptores.(19)

Se sabe que estos receptores no se asocian necesariamente con estimulación o con inhibición, sino que simplemente su efecto final depende, en último extremo, del tipo y cantidad de receptores que exista en un órgano concreto, por lo que la mayoría de los órganos están predominantemente controlados por uno de los dos sistemas.

A nivel ocular, los *receptores*  $\alpha_2$  están presentes en el cuerpo ciliar, en el iris, en el complejo de la membrana de Bruch y en la retina neurosensorial. En relación a la superficie ocular, se sabía que estaban presentes en la córnea, pero tras los resultados publicados por el grupo de trabajo de Superficie Ocular del IOBA, se sabe que también están presentes en la conjuntiva. (3,4) Éste mismo grupo de trabajo también ha demostrado que estos mismos receptores se sobreexpresan en la conjuntiva cuando las células se incuban con citocinas proinflamatorias como el INF- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$ .(3,4)

En oftalmología, la importancia de los *receptores*  $\alpha_2$  *adrenérgicos* se ha relacionado con su capacidad para regular la presión ocular, siendo capaces de modular la liberación de neurotransmisores en el cuerpo ciliar, logrando que su estimulación puede regular el flujo de humor acuoso por dos vías, por una parte disminuyendo la secreción de humor acuoso, y por otra, aumentando el drenaje úveo-escleral.(20-21)

### **2.B.1.2. FARMACOS ALFA-2 AGONISTAS. BRIMONIDINA**

En medicina el arsenal de fármacos disponibles para modular el SNA es numeroso, y ello es debido al importante papel que este sistema juega en el mantenimiento de las funciones vegetativas del organismo; por este mismo motivo, se comprende el deseo de la farmacología, y por ende de la medicina en general, de entender cada día mejor los fármacos que actúan sobre dicho sistema. (9,22)

La base de la utilización en medicina de estos fármacos se basa en tres principios generales; en primer lugar están aquellos fármacos que imitan la actividad de los neurotransmisores al interactuar con sus receptores, son los denominados agonistas colinérgicos o adrenérgicos; en segundo lugar, están aquellos fármacos que reducen o suprimen la actividad de uno u otro sistema mediante el bloqueo de sus respectivos neurotransmisores, son los fármacos antagonistas o bloqueantes colinérgicos o adrenérgicos; y por último, están aquellos fármacos que modulan la unión del neurotransmisor al receptor, regulando por tanto la síntesis, el almacenamiento sináptico o el mecanismo de desaparición del neurotransmisor. (9)

En base a los patrones anteriores, los fármacos alfa agonistas serían definidos como aquellos fármacos que al fijarse sobre los receptores  $\alpha$ , los activarían, provocando respuestas similares a las que se conseguirían al estimular fibras nerviosas postganglionares simpáticas o de la médula suprarrenal.

Hay fármacos que son agonistas específicos de los receptores alfa-2 adrenérgicos: la clonidina, la apraclonidina o la brimonidina.

La brimonidina, en concreto, es un fármaco  $\alpha_2$  agonista utilizado habitualmente para el tratamiento de pacientes con HTO, glaucoma crónico de ángulo abierto e HTO post-cirugía ocular o tras tratamientos con láser argón o láser YAG (*yttrium aliminium garnet*) de holmio o neodimio. (22)

Su mecanismo de acción es altamente selectivo y mil veces más potente sobre los receptores  $\alpha_2$  que la clonidina o la apraclonidina (fármacos de su mismo grupo); gracias a esta acción favorece el control de la PIO al disminuir, tanto la producción de humor acuoso a nivel del cuerpo ciliar como al favorecer la eliminación del mismo a nivel de la vía úveo-escleral; además, podría tener, según estudios recientes en animales, una actividad neuroprotectora sobre las fibras nerviosas del nervio óptico.(22)

Este principio activo sufre una primera metabolización a nivel hepático, para luego distribuirse a nivel sistémico y ser finalmente eliminado a nivel renal.

De la interacción con otros receptores situados en localización distinta a la ocular, se derivan sus principales efectos secundarios; así, de un 10 a un 30% de los pacientes tratados con brimonidina pueden presentar síntomas sistémicos como xerostomía, cefalea, mareos o fatiga; y está contraindicado su uso en pacientes en tratamiento con IMAOS. (22) De forma menos frecuente, en casi un 10% desencadena otros efectos secundarios como ansiedad, depresión, palpitaciones o insomnio, entre otros.

Desde el punto de vista oftalmológico, lo más importante es que puede producir una llamativa inflamación conjuntival, que remeda una reacción alérgica, incluso tras un año de tratamiento, y que se caracteriza por la aparición de hiperemia conjuntival, sensación de cuerpo extraño, irritación ocular con prurito y ardor, y visión borrosa. Esta reacción es tan invalidante para el paciente que obliga al oftalmólogo, en la mayoría de los casos, a retirar el tratamiento a pesar de los buenos resultados conseguidos en el control de la PIO.(22)

### **2.B.1.3. RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS**

Según la clasificación de los receptores adrenérgicos dada por Ahlquist en 1948, los receptores  $\beta$  eran aquellos receptores selectivamente estimulados por las siguientes catecolaminas, en este orden: isoprenalina > Adr > NA; y eran antagonizados de forma selectiva, entre otros fármacos, por el propanolol. (8,9)

Estructuralmente, los receptores  $\beta$ , al igual que los  $\alpha$ , están asociados a proteína G, por lo que su mecanismo de actuación es similar.

Existen dos subtipos de receptores  $\beta$ , con funciones distintas y distribuidos en diferentes tejidos y/o células. Los receptores  $\beta_1$  predominan a nivel cardiaco y se caracterizan por su alta afinidad, y prácticamente idéntica, por la Adr y por la NA; en cambio, los receptores  $\beta_2$  localizados, fundamentalmente, en el músculo liso tienen entre unas 10 a 50 veces mayor afinidad por la Adr que por la NA. Estos datos estructurales se confirmaron con estudios farmacológicos que usaban sustancias antagonistas específicas para los receptores  $\beta_1$  como el metaprolol, o la butaxonamina para los  $\beta_2$ .

Más reciente ha sido el descubrimiento de un receptor  $\beta_3$ , localizado predominantemente en el tejido adiposo, y que es unas 10 veces más sensible a la NA que a la Adr, presentando escasa afinidad por el propanolol.(9)

Lo habitual es que en un tejido coexistan receptores de ambos subtipos, por lo que la acción final de la Adr y/o la NA sobre dicho tejido vendría dada por su unión sobre el receptor que

se encuentre en mayor proporción; así, los receptores  $\beta_1$  se localizan, fundamentalmente, a nivel del músculo cardiaco, y al ser activados producen taquicardia; también se pueden encontrar, aunque de forma mucho más reducida, a nivel del epitelio ciliar. En cambio, los receptores  $\beta_2$  se localizan fundamentalmente a nivel del músculo liso y, en mucha mayor medida que los anteriores, a nivel del epitelio ciliar, por lo que su activación da lugar a dilatación del músculo liso y a un aumento de la producción de humor acuoso.(22)

Estudios llevados a cabo en animales y en células cultivadas en laboratorio bajo diversas condiciones, han demostrado que los receptores  $\beta_2$  se mantienen con expresión estable en la membrana celular cuando las células cultivadas se tratan con citocinas proinflamatorias, es más, incluso en determinadas situaciones aumentan su expresión.(3)

#### **2.B.1.4. FÁRMACOS BETA-BLOQUEANTES**

Los fármacos  $\beta$ -bloqueantes son sustancias que muestran una alta afinidad y especificidad por los receptores  $\beta$ , inhibiendo tanto su actividad simpática como la respuesta a los fármacos  $\beta$  agonistas.(22)

La mayor parte de estos fármacos son derivados de la molécula isoprenalina, manteniendo en su cadena lateral el grupo isopropilo, que es el responsable de la afinidad por el receptor  $\beta$ -adrenérgico.

Dentro de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes se pueden distinguir fármacos *no selectivos*, es decir, aquellos que actúan de forma equipotente tanto en receptores  $\beta_1$  como  $\beta_2$ , y que por tanto, además de lograr el efecto deseado a nivel ocular de reducir la PIO, llevarán asociados efectos no deseados al actuar sobre receptores del músculo cardiaco. Por otro lado están los fármacos denominados *cardioselectivos*, ya que tienen una actividad más potente a nivel de receptores  $\beta_1$  y con un mínimo efecto broncodilatador derivado de receptores  $\beta_2$ . (22)

A nivel ocular, el fármaco  $\beta$ -bloqueante ideal sería aquel que tuviese como acción principal disminuir la producción de humor acuoso, con el objetivo de lograr un descenso de la PIO, y que presente el menor número posible de efectos colaterales a nivel sistémico. Por ello, el fármaco  $\beta$ -bloqueante más utilizado en oftalmología es el timolol, siendo éste un fármaco no selectivo, pero, que a diferencia de otros de su mismo grupo, presenta escasa actividad a nivel cardiaco.

La principal limitación en el uso de estos fármacos viene dada por la posibilidad de aparición de importantes efectos secundarios, no tanto a nivel ocular, sino más bien a nivel sistémico.

Las complicaciones que pueden aparecer a nivel ocular incluyen síntomas leves de alergia ocasional, erosiones epiteliales puntiformes o una disminución en la producción del componente acuoso de la lágrima, pero todas ellas suelen aparecer de forma leve y esporádica.

Más graves, en cambio, son los posibles efectos descritos a nivel sistémico, tales como la aparición de bradicardia e hipotensión por un efecto  $\beta_1$ , broncoespasmo por un efecto  $\beta_2$ , depresión, fatiga, cefalea, trastornos del sueño, alucinaciones o un descenso de la libido, entre otros. (22) Por todo ello, estos fármacos están contraindicados de forma específica en pacientes con asma, enfermedad obstructiva de las vías aéreas (EPOC), bradicardia, bloqueos cardíacos o insuficiencia cardíaca congestiva.

## **2.B.2. UNIDAD FUNCIONAL LAGRIMAL(UFL)**

### **2.B.2.1. Concepto**

La parte expuesta del globo ocular, formada por la conjuntiva bulbar y la córnea, está cubierta por una delgada película líquida conocida como película lagrimal (PL); esta película permanece en contacto directo con el medio, protegiendo al ojo de influencias externas y manteniendo la salud de la córnea y la conjuntiva subyacentes.

En condiciones fisiológicas se precisa de un aporte adecuado, tanto en cantidad como en calidad, de esta película lagrimal, función para la cual se requiere del buen funcionamiento de diversas estructuras interconectadas a distintos niveles, y cuyo propósito final es mantener la transparencia de la córnea y la calidad de la imagen proyectada en la retina.

Lo que se conoce como Unidad Funcional Lagrimal (UFL) (23-25) es la conjunción de los epitelios de la superficie ocular (de la conjuntiva, la córnea y el limbo), de todas las glándulas productoras de componentes de la lágrima y el sistema neuro-humoral que los conecta y mantiene. Además, se incluyen los nervios sensitivos que transmiten información acerca del estado de la UFL al centro lagrimal del sistema nervioso central y los nervios secretomotores que de allí envían impulsos de vuelta. (23-25) Figura.1

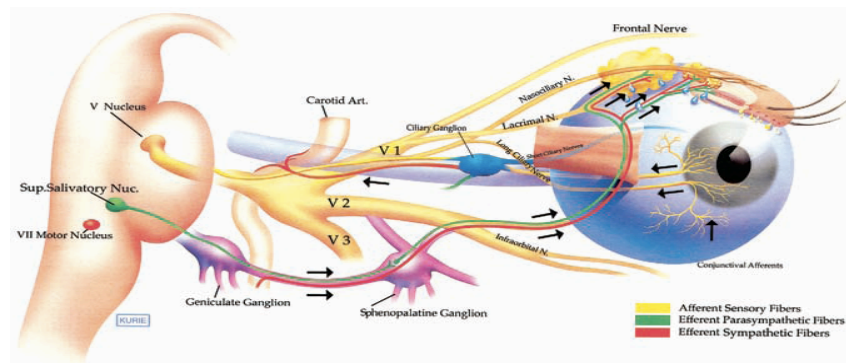


Figura 1. Vías nerviosas que integran la unidad funcional lagrimal (25)

### 2.B.2.2. Epitelio Córneo-Conjuntival

Dentro de la UFL se encuentran estructuras anatómicamente independientes, pero que fisiológicamente actúan como una, como es el caso del epitelio córneo-conjuntival. Figura 2

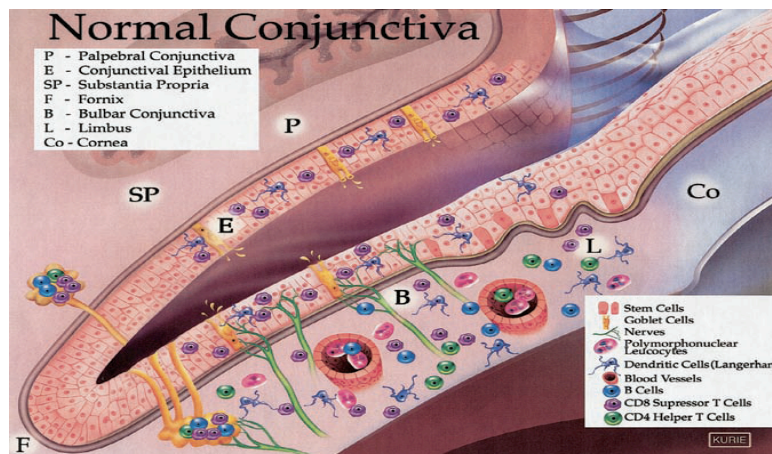


Figura 2. Esquema del epitelio córneo-conjuntival (25)

El **epitelio corneal** es de tipo escamoso estratificado no queratinizado. Su grosor es de aproximadamente 50 micras, lo que corresponde al 10% del grosor total de la córnea. Está compuesto de 5 o 6 capas de 3 diferentes tipos celulares: (25-27) Figura 3

1. Células superficiales, que como su nombre indica, es la capa de células más externa del epitelio. Está compuesta por 2 o 3 capas de células poligonales cubiertas por microvellosidades, lo que aumenta la superficie de contacto para optimizar la toma de oxígeno y nutrientes provenientes de la lágrima. Además, en su membrana celular se encuentran múltiples glicoproteínas, denominadas en conjunto, glicocáliz, y cuya función principal es la de conferir propiedades hidrofílicas a la capa anterior de la córnea, y mantener así una fuerte interacción con la capa de mucina de la película lagrimal, ayudando a mantener su estabilidad. Las uniones intercelulares de



esta capa son de tipo desmosomas y “*tight junctions*”, lo que crea una barrera anatómica, obligando, así, a que el transporte de sustancias se realice por vía transcelular.

2. Células aladas o suprabasales, localizadas entre las células superficiales y basales del epitelio. Conforman 2 o 3 capas celulares, y reciben su nombre por el aspecto que presentan al ser observadas al microscopio electrónico, ya que tienen forma de ala. Se caracterizan por presentar un estadio de maduración intermedio, con abundantes tonofilamentos intracelulares ricos en queratina. Están unidas entre sí por desmosomas y uniones tipo “*gap junctions*”.

3. Células basales, que conforman una monocapa de células en íntimo contacto con la membrana basal epitelial. De todas las células del epitelio corneal, son las únicas con capacidad mitótica, originándose de ellas las células aladas y superficiales. Se unen entre sí por desmosomas y uniones tipo “*gap junctions*”, y a la membrana basal por hemidesmosomas. Estos, a su vez, están unidos a fibras de anclaje conformadas por colágeno tipo VII que perforan la membrana basal y se unen a placas de anclaje en el estroma superficial formados por colágeno tipo I. Este sistema en condiciones normales mantiene el epitelio fuertemente adherido al estroma.

La membrana basal del epitelio corneal es secretada por las células basales; tiene un grosor aproximado de 40 a 60 nanómetros y está formada por una lámina lúcida más externa y una lámina densa en contacto con la capa de Bowman. El principal componente de la membrana basal es el colágeno tipo IV.

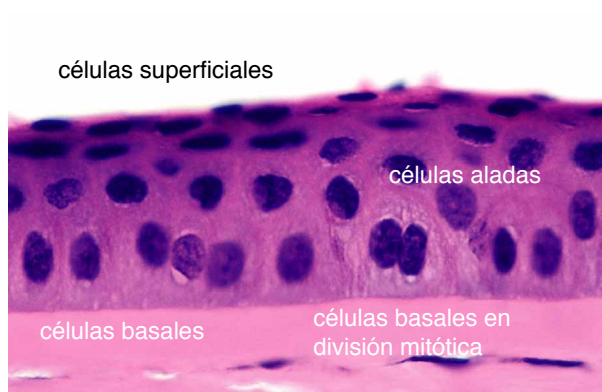


Figura. 3. Micrografía óptica. Epitelio corneal con sus diferentes capas celulares (Elaboración propia)

La regeneración de este epitelio corneal tiene lugar en el limbo esclero-corneal, zona de transición del epitelio corneal, de tipo escamoso, estratificado y no queratinizado, al epitelio conjuntival, de tipo columnar, estratificado y no queratinizado. La gran importancia del limbo radica en que en él residen las células madre encargadas de la regeneración corneal; estas células se

encontrarían en las capas más profundas del limbo, y presentan una capacidad reproductiva ilimitada, aunque lenta, en condiciones fisiológicas normales. (25-27)

El otro componente de esta unidad córneo-conjuntival es el **epitelio conjuntival** (Figura 4); es de tipo escamoso, poliestratificado y no queratinizado, y se une al epitelio corneal en el limbo y a la dermis en el borde palpebral. La capa más profunda de este epitelio está formada por células cuboideas, y la más superficial por células cilíndricas. En el borde superior de estas células se encuentran las microvellosidades, que son proyecciones del citoplasma cuya función es aumentar la superficie de contacto. Estas microvellosidades, al igual que sucede en la córnea, están recubiertas por el glicocálix, que es la parte más interna de la capa mucosa. El estudio de la conjuntiva bajo microscopía electrónica demuestra la presencia de hasta cinco tipos de células con misiones tan dispares como la producción de mucina, enzimas y de otras proteínas presentes en la secreción lagrimal, así como la absorción de sustancias desde ésta última. (25-27)

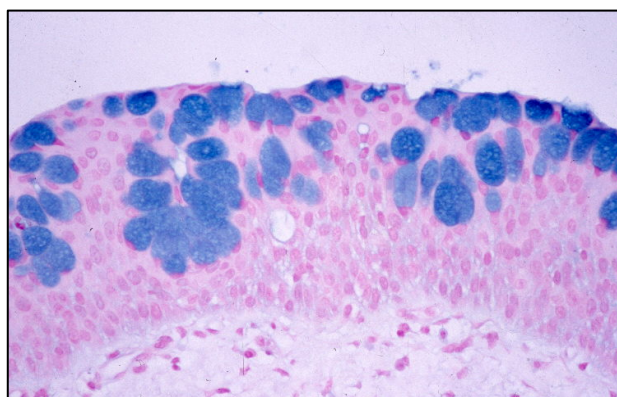


Figura. 4. Micrografía óptica. Epitelio conjuntival con sus diferentes capas celulares (Elaboración propia)

Las células del epitelio conjuntival, al igual que sucede en la córnea, están adheridas entre sí por uniones tipo “*tight junctions*”. Este dato es de extrema importancia, ya que explica el mecanismo de acción y la toxicidad de muchos fármacos administrados por vía tópica conjuntival. Como ejemplo, los siguientes datos:

- Para que un fármaco atraviese la barrera epitelial de la conjuntiva, entre otros factores, necesita disponer de una concentración de principio activo muy elevada. Si se tiene en cuenta que una gran mayoría del fármaco llega a la circulación general por la absorción de la mucosa conjuntival y nasal, a través del conducto lácrimo-nasal, se puede comprender la extraordinaria toxicidad sistémica que presentan ciertos colirios, como por ejemplo, los que poseen en su composición agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos.

- La mayoría de los colirios llevan en su composición conservantes para mantener la esterilidad del preparado. Estos conservantes tienen un importante efecto nocivo sobre el epitelio córneoconjuntival, responsable de la toxicidad local de muchos de los fármacos administrados por vía tópica conjuntival. Figura 5.
- Sin embargo, los conservantes tienen la ventaja de que al alterar la barrera epitelial favorecen la penetración de los fármacos a nivel intraocular, incrementando, por tanto, su efecto terapéutico, y posibilitando una disminución en su concentración a nivel sistémico.

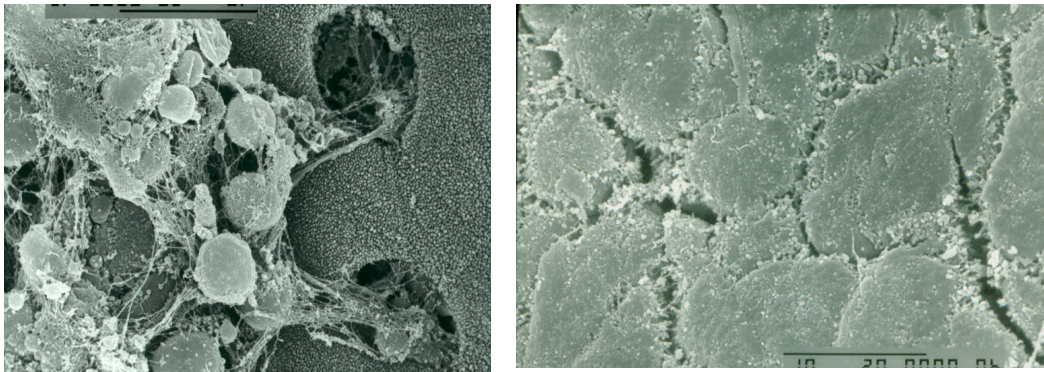


Figura. 5. Microscopía electrónica de barrido del epitelio conjuntival antes (izquierda) y después (derecha) de 3 meses de tratamiento con un colirio con conservantes (1 gota cada 12 horas). En la foto pre-tratamiento (izquierda) se observan 2 células caliciformes expulsando su contenido de moco. También se aprecia la integridad de las uniones intercelulares del epitelio superficial. En la foto post-tratamiento (derecha) se observa una ausencia de células caliciformes y de moco con ruptura de las uniones intercelulares (Imágenes de conjuntiva de cobaya) (Cedido por IOBA)

Respecto a la regeneración del epitelio conjuntival, los datos no son tan claros como en el epitelio corneal, y como ejemplo, se especula con la posibilidad de que las células madre de la conjuntiva se encuentren bien en los fondos de saco, en las uniones mucocutáneas del borde palpebral o, alternativamente, de forma parcheada por toda la superficie ocular. (25-27)

### ***2.B.2.3. Película Lagrimal***

La película lagrimal es la porción de la UFL que se encuentra directamente en contacto con el medio ambiente. Su importancia radica en la protección que ofrece al ojo frente a influencias externas dañinas (sequedad del ambiente y agentes infecciosos entre otras), y en su capacidad para mantener la integridad de la córnea y la conjuntiva.

Tiene un volumen de 6-9  $\mu$ l y está compuesta por agua en un 98%; su pH normal varía entre 6,5 y 7,6 y su osmolaridad entre 310 y 334 mOsm.

El recambio de la película lacrimal en condiciones basales es de 1,2  $\mu\text{l}/\text{minuto}$ , siendo evacuada en su mayoría a través del sistema de drenaje nasolacrimal. Sólo una pequeña porción, de aproximadamente 3  $\mu\text{l}/\text{hora}$ , se pierde por evaporación.

Sus funciones principales son:

- Ser la primera superficie refractiva del ojo, ya que al estar en contacto con el aire en ella se genera el mayor intercambio refractivo.
- Mantener un ambiente húmedo para las células epiteliales de la córnea y la conjuntiva.
- Tener propiedades bactericidas, ya que posee sustancias tales como la lactoferrina, lisozima, transferrina, lipocalina, beta-lisina, inmunoglobulinas, defensinas, factores del complemento y contener en suspensión leucocitos.
- Transportar productos metabólicos, fundamentalmente, oxígeno y dióxido de carbono, hacia y desde el epitelio córneo-conjuntival.
- Servir de vehículo para herramientas inmunológicas de la respuesta inflamatoria en caso de agresión a la superficie ocular.
- Diluir y eliminar elementos tóxicos y/o nocivos.

Respecto a su estructura, la película lagrimal consta de tres capas: la capa lipídica o anterior, la capa acuosa o intermedia y la capa mucosa o profunda. Figura 6

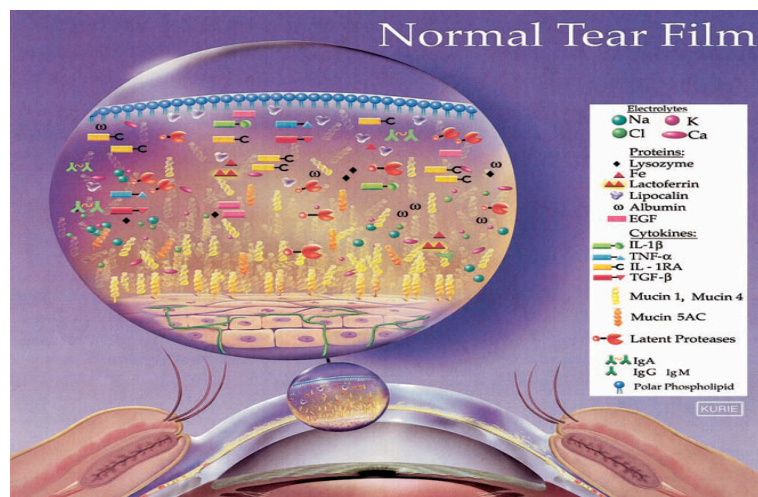


Figura 6. Película lagrimal normal y sus componentes (25)

Es probable que in vivo esta estructura trilaminar no esté tan netamente diferenciada, existiendo un gradiente en los componentes de cada una de sus capas. De este modo, es posible que la cantidad de componente acuoso, que se había estimado en torno a un 95% se quede reducida a un 60%, como se ha evidenciado en varios estudios de microscopía confocal. (25)

### **a)Capa Lipídica**

Es la capa más superficial de la película lagrimal, con un grosor de 0,1 a 0,2  $\mu\text{m}$ , compuesta por lípidos secretados por las glándulas de Meibomio, las glándulas sebáceas de Zeiss y las glándulas sudoríparas modificadas apocrinas de Moll. (25)

Las propiedades de estos lípidos confieren tensión superficial a la película lagrimal, permitiendo su distribución homogénea sobre la superficie ocular, evitando la evaporación excesiva de la capa acuosa e impidiendo su rebosamiento, por lo que mantiene un menisco lagrimal estable en contacto con el borde libre. Además, impide que ácidos grasos provenientes de la piel pudiesen contaminar la película lagrimal, haciéndola inestable.

Su secreción está sometida a diferentes puntos de regulación:

- Factores mecánicos, ya que el parpadeo “exprime” las glándulas de Meibomio.
- Factores neurogénicos; así el sistema parasimpático estimula su secreción y el simpático la disminuye.
- Factores hormonales; se sabe que los corticoides y los andrógenos estimulan su secreción, y los estrógenos la disminuyen.
- Factores físicos, ya que parece que la propia tensión superficial de la película lagrimal puede regular tanto, cualitativa como cuantitativamente, la secreción lipídica.

### **b)Capa Acuosa**

Es la capa intermedia de la película lagrimal y la de mayor grosor, aproximadamente de 20-30  $\mu\text{m}$ ; es secretada por la glándula lagrimal principal y las glándulas accesorias de Krause y Wolfring a un ritmo de 2-3 ml/día.

Existen dos tipos de secreción lagrimal, la secreción basal, más o menos constante y que no obedece a estímulos externos, y la secreción refleja que responde a diversos estímulos, como son los mecánicos o los afectivos. Parece demostrado que la secreción basal procede principalmente de las glándulas accesorias de Krause y Wolfring, y que la glándula lagrimal principal actúa como reservorio ante cualquier estímulo reflejo. (25)

La secreción de la fase acuosa está regulada por diferentes factores:

- Control neuronal, ya que tanto el sistema simpático como el parasimpático estimulan su producción.
- Control endocrino, ya que parece que los andrógenos estimulan su secreción.

- Control neurocrino; se sabe que los neurotransmisores clásicos pueden ejercer su efecto a través del torrente circulatorio, y no en la sinapsis, como si se tratase de hormonas. La mayoría son estimulantes de la secreción acuosa.
- Control autocrino o paracrino; así la histamina, el factor de crecimiento epitelial, las prostaglandinas y los leucotrienos estimulan la secreción acuosa.

Respecto a la composición de la capa acuosa (Tabla 1), un 98,2% es agua y un 1,8% son biomoléculas, entre las que se encuentran las proteínas secretadas por las células acinares, que suponen de 6 a 20 mg/ml. De ellas, debido a su importancia reconocida en el diagnóstico del síndrome de ojo seco, y en la interrelación con fenómenos inflamatorios en la superficie ocular, destacan:

### 1. Lisozima o muramidasa

La lisozima es una enzima bacteriolítica que se halla en altas concentraciones en el suero y en la lágrima, donde alcanza unos niveles aproximados de 1 a 2 mg/ml. Estructuralmente está formada por una cadena polipeptídica de 14.600 daltons de peso molecular, y es sintetizada en las glándulas lagrimales principal y accesorias. Su actividad antimicrobiana se basa en su capacidad de inducir la lisis de la membrana celular de algunos microorganismos, principalmente gram negativos y hongos, al romper el enlace  $\beta$ 1-4 entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico.

La determinación de su concentración se ha demostrado como herramienta útil en el diagnóstico del síndrome de ojo seco (en el que suele aparecer disminuida). (25-27)

### 2. Lactoferrina y lactotransferrina

Se trata de una glicoproteína de 80.000 daltons de peso molecular, secretada por las glándulas principal y accesorias. Alcanza en lágrima valores medios de unos 2 mg/ml. La lactoferrina se une reversiblemente a 2 átomos de hierro, siendo su afinidad por este ión 300 veces superior a la de otras proteínas transportadoras de hierro, como la transferrina. Es esta afinidad por el hierro la que le confiere propiedades bacteriostáticas, principalmente contra bacterias Gram positivas, al extraer del medio un ión, como el hierro, que es esencial en el metabolismo microbiano.

La medida de su concentración también resulta útil en el diagnóstico del síndrome de ojo seco. (25-27)

### 3. Beta lisina

No se conoce bien su procedencia, pero se sabe que tiene la capacidad de destruir las membranas celulares de algunas bacterias.

### 4. Prealbúmina lagrimal específica

Secretada por la glándula lagrimal actúa como sistema tampón y como transportador de retinol en la lágrima.

### 5. Inmunoglobulinas y complemento

En la lágrima existen todos los tipos de inmunoglobulinas, aunque sólo la IgA está en cantidades significativas. La IgA se sintetiza en las células plasmáticas de las glándulas lagrimales. El “componente secretor”, proteína que mantiene unidas a dos moléculas de IgA, se sintetiza en los acinos de las glándulas.

La IgA tiene varias misiones fundamentales para el mantenimiento de la integridad de la superficie ocular:

- Previene la adhesión de bacterias a la superficie de las células epiteliales.
- Aglutina bacterias.
- Inactiva toxinas y enzimas bacterianos.

### 6. Electrolitos: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> y otros

Son los responsables del flujo osmótico entre las células epiteliales y la película lagrimal, manteniendo, así, la osmolaridad de la lágrima en aproximadamente 318 mOsm/L.

Además, actúan como cofactores enzimáticos en el control de la permeabilidad celular.

### 7. Moléculas que proceden de la circulación general

Como la urea, la glucosa, el lactato, el citrato, el ascorbato y los aminoácidos.

### 8. Oxígeno

El volumen de oxígeno presente en la película lagrimal constituye la mayor fuente de nutrición aeróbica para la córnea, especialmente para su epitelio.

Tabla 1. Composición capa Acuosa (Elaboración propia; 25-27)

Lágrimas		4. Sustancias nitrogenadas	
<b>Propiedades físicas</b>		Proteínas totales	0,668-0,800 g/100 mL
pH	7,4 (7,2-7,7)	Albumina	0,392 g/100 mL
Presión osmótica	305 mOsm/kg	Globulinas	0,2758 g/100 mL
	Equiv. NaCl 0,95 %	Amoníaco	0,005 g/100 mL
Índice de refracción	1,357	Ácido úrico	
Volumen	0,50-0,67 g/16 horas (1)	Urea	0,04 mg/100 mL
<b>Propiedades químicas</b>		Nitrógeno total	158 mg/100 mL
1. Composición general de la lágrima		Nitrógeno no proteico	51 mg/100 mL
Agua	98,2 g/100 mL	5. Hidratos de carbono	
Sólidos (total)	1,8 g/100 mL	Glucosa	2,5 (0-5,0) mg/100 mL
Cenizas	1,05 g/100 mL	6. Esteroles	
2. Electrolitos		Colesterol y ésteres de colesterol	8-32 mg/100 mL
Sodio	120-170 mmol/L	7. Varios	
Potasio	26-42 mmol/L	Ácido cítrico	0,6 mg/100 mL
Calcio	0,3-2,0 mmol/L	Ácido ascórbico	0,14 mg/100 mL
Magnesio	0,5-1,1 mmol/L	Lisozima	1-2 mg/mL
Cloruro	120-135 mmol/L	Aminoácido	7,58 mg/100 mL
Bicarbonato	26 mmol/L	Ácido láctico	1-5 mmol/L
3. Antiproteinasas		Prostaglandina	75 pg PF/mL
$\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ -at)	0,1-3,0 mg%		300 pg PF/mL
$\alpha_1$ -antiqumotripsina	1,4 mg%	Catecolamina	0,5-1,5 $\mu$ g/mL
Inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina	0,5 mg%	Complemento	Dilución 1:4
$\alpha_2$ -macroglobulina	3-6 mg%		(Prueba hemolítica)

### c) Capa de Mucina

La capa de mucina es la más interna de las tres capas de la película lagrimal y se encuentra en íntimo contacto con el epitelio corneal. Su estructura y composición no se conocen exactamente todavía, en parte, debido a su complejidad. Se sabe que está formada, principalmente, por unas glicoproteínas denominadas mucinas (MUC) asociadas a otra serie de proteínas, electrolitos y restos de material celular. (25)

Su origen principal son las células caliciformes de la conjuntiva, que son las células epiteliales tipo I. Pero además, existe un sistema secundario productor de moco, que incluye otras células epiteliales como son las de tipo II y tipo III, la glándula lagrimal principal y las accesorias. (28) Las células epiteliales de la córnea también secretan parte de estas mucinas, aunque en menor grado que las conjuntivales. (29)

La función principal de esta capa es la de disminuir la tensión superficial de la PL, y de esta forma humectar el epitelio córneo-conjuntival, que es de carácter hidrofóbico. Elimina, también, las irregularidades del epitelio corneal para obtener una superficie homogénea de mejor calidad óptica. Además, proporciona protección mecánica a la córnea, ya que elimina pequeños elementos extraños, y tiene propiedades antimicrobianas. (25)


El concepto de gel hidromucínico, que engloba a las dos capas más profundas anteriormente descritas, fue propuesto hace más de una década por Prydal. (28) La importancia de la capa mucosa en esta teoría es el punto de partida para el conocimiento con más detalle de los componentes de la misma. Figura 7




Capa lipídica

Gel hidromucínico

Epitelio corneal

 Mucinas transmembrana

 Mucina de secreción

 Trefoil Factor (TFF)

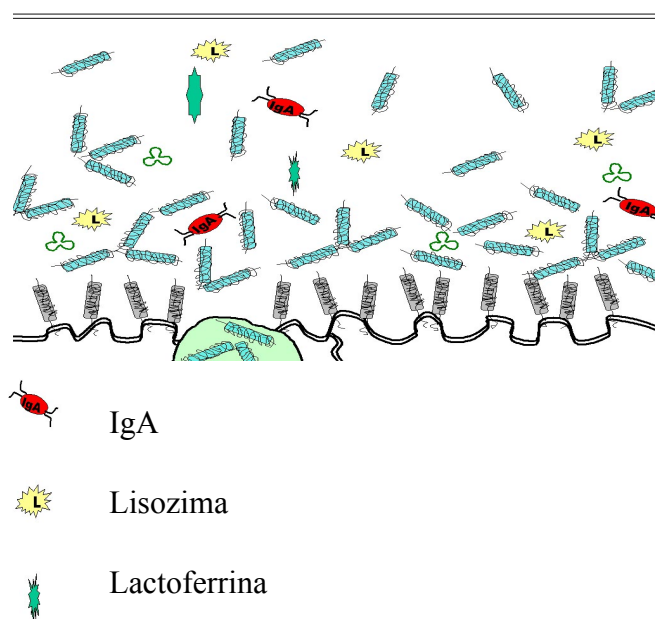


Figura 7. Estructura del gel hidromucínico de la película lagrimal con sus principales componentes (28)

La capa acuosa de la PL está embebida en la red de mucinas. Su concentración en el gel hidromucínico es inversamente proporcional a la de las mucinas, ya que el contenido de agua en el gel es mayor hacia la superficie.(28,29) La existencia de la capa mucosa es esencial para poder alargar el periodo de residencia de la lágrima, pues sin ella, la evaporación sería excesivamente rápida.

Para un mejor conocimiento de la estructura del gel hidromucínico, es necesario describir más detalladamente la naturaleza de su componente más importante, las mucinas.

#### **2.B.2.4. Mucinas**

Las mucinas son un grupo heterogéneo de proteínas de elevado peso molecular, >200 kilodaltons (KDa), que forman parte de todas las secreciones mucosas presentes en los epitelios. Están altamente glucosiladas, constituyendo los azúcares un elevado porcentaje de su composición, más del 50%, lo que hace que su estudio bioquímico sea difícil. (29) Tienen un elevado contenido en galactosa, ácido siálico, glucosamina, glucosa, fucosa, galactosamina y manosa, unidos al núcleo a través de la estructura NacGal-O-Ser/Thr.(29) El análisis de aminoácidos indica una alta proporción en residuos de serina y treonina, típico de glucoproteínas con enlace a través del oxígeno, tipo O-glucídico, entre el núcleo proteico y los azúcares. La hidrólisis alcalina y la reducción con borohidruro sódico tritiado, que libera cadenas de oligosacáridos unidos a serina y treonina mediante O-galactosa, permite comprobar que tienen esa estructura.(29)

La secuenciación, total o parcial, de los genes que codifican las mucinas humanas ha permitido un mayor conocimiento de su estructura y de su función, así como comprobar su carácter heterogéneo. Hasta ahora se conocen 17 genes de mucinas humanas, que se han enumerado como MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16 y MUC17. (29)

Cada gen produce una secuencia única de aminoácidos, que se repite en tándem en el núcleo proteico un número determinado de veces, siendo característica para cada uno de los genes. La variación alélica de las repeticiones en tándem contribuye al polimorfismo de las mucinas, es decir, que el número de las repeticiones también cambia entre individuos, además de entre tejidos. El elemento común a todos ellos es el elevado porcentaje de residuos de serina, prolina y treonina, que son los aminoácidos donde se produce la glucosilación. (29)

Las mucinas se clasifican en dos grandes grupos, transmembrana y de secreción:

A) Las **mucinas transmembrana** son aquellas que su porción extracelular contiene una región repetida en tándem, rica en serina, treonina y prolina, donde se produce la O-glucosilación, y cuyo número de repeticiones varía entre tejidos e individuos, número variable de la región en tándem -NVRT-. (29,30)

En este grupo se incluyen la MUC1, la MUC3A, la MUC3B, la MUC4, la MUC12, la MUC13, la MUC15, la MUC16 y la MUC17.

B) Las **mucinas de secreción**, en cambio, son aquellas mucinas que no tienen el dominio hidrofóbico de integración en la membrana. Se clasifican en dos subgrupos. (29,30)

B.1) Mucinas formadoras de gel, que se caracterizan porque la unión de monómeros mediante enlaces disulfuro da lugar a polímeros, que tienen unos dominios ricos en cisteína y otros similares al factor de Von Willebrand, a través de los cuales también pueden polimerizar.

Entre éstas se encuentran la MUC2, la MUC5AC, la MUC5B y la MUC6.

B.2) Mucinas solubles, que son aquellas que no pueden formar polímeros porque carecen de las regiones ricas en cisteína.

En este grupo se incluyen la MUC7 y la MUC9.

C) **Mucinas No clasificadas**, que son aquellas mucinas que todavía no están lo suficientemente caracterizadas como para poder ser encuadradas dentro de un grupo. Son la MUC8 y la MUC11.(29,30)

*A nivel ocular* se encuentran las denominadas mucinas oculares; se sabe que de los 17 genes de mucinas que han sido descritos, solamente seis de ellos se expresan en la superficie ocular: MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC7 y MUC16. Tabla 2.

Tabla 2. Genes de mucinas expresados en la superficie ocular. TM: transmembrana, FG: formadora de gel; S: soluble; ?: no determinado; +/-: expresión variable (Elaboración propia;29,30)

Mucina (tipo)	Epitelio conjuntival	C. calciformes	Epitelio corneal	Limbo
MUC1 (TM)	+	-	+	+
MUC2 (FG)	+	?	-	?
MUC4 (TM)	+	+	+	+
MUC5AC (FG)	-	+	-	-
MUC7 (S)	+	?	-	?
MUC16 (TM)	+	+/-	+	?
MUC 15(TM)	+	?	?	?

### **2.B.3. Citocinas y quimiocinas**

Los pacientes tratados con fármacos tópicos antiglaucomatosos sufren cambios en su superficie ocular, como hiperemia, descenso en el tiempo de ruptura lagrimal o leve queratitis, entre otros; la inflamación parece ser la causante de estos signos clínicos y podría ser ésta un factor de riesgo importante en el fallo de dicha terapia.(31-33)

Parece ser que las citocinas jugarían un papel clave en esta respuesta inmune e inflamatoria, ya que son capaces de regular la activación, diferenciación y proliferación de las células inmunocompetentes de la conjuntiva.(33-34)

Además se han encontrado niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias en lágrima de distintas patologías de la superficie ocular como la alergia, la rosácea o el síndrome de ojo seco (SOS).(35-37)

En los últimos 25 años, los conocimientos sobre las citocinas han permitido que se les asigne un papel importante en medicina como agentes diagnósticos, pronósticos y terapéuticos en diversas patologías.(38) Así, la medida de citocinas en lágrima puede ayudar a identificar el patrón inflamatorio de la superficie ocular de los pacientes sometidos a tratamiento tópico antiglaucomatoso.

Las citocinas son moléculas proteicas de bajo peso molecular, presentes en todo el organismo y que intervienen en múltiples procesos biológicos, especialmente en aquellos orientados a regular la interrelación entre los distintos componentes celulares de la respuesta inmune. Las citocinas sintetizadas por los linfocitos cooperadores (Th), auténticos directores de orquesta de la respuesta inmune adaptativa, son diferentes según la subpoblación Th que las sintetice. En la actualidad se habla de respuestas Th1 o Th2 (y más recientemente de Th17) dependiendo del tipo de activación de los linfocitos Th que las han sintetizado. Las respuestas (y por lo tanto citocinas sintetizadas) Th1 y Th17 son proinflamatorias, mientras que las Th2 son respuestas mediadas por activación de linfocitos B y síntesis de diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas.

De modo que basándonos en el tipo de citocinas que se producen en diferentes situaciones patológicas, las reacciones alérgicas se consideran fruto de una respuesta inflamatoria de tipo Th2, mientras que el SOS está encuadrado como una respuesta de tipo Th1.

Durante años se ha aceptado que ambos tipos de respuestas inflamatorias son mutua y recíprocamente inhibitorias; sin embargo, recientes hallazgos han demostrado que ambos tipos de respuestas pueden interactuar (mediante las citocinas sintetizadas en cada una) como parte de un complejo sistema regulador en el desarrollo de la inflamación. (35)

Las **quimiocinas** son un subgrupo de citocinas que se caracterizan por tener una actividad quimiotáctica común a todas ellas; son pequeñas proteínas de secreción, de entre 8 a 10 KDa. Se clasifican en cuatro grupos: CC, CXC, C y CX3C en función de la posición de los residuos de cisteína en su estructura. Su acción biológica está mediada por receptores transmembranales asociados a proteína G, en concreto CCR1-10, CXCR1-6, XCR1 y CX3CR1.(39-41) Además de sus bien conocidas propiedades quimioatrayentes, capaces de inducir la migración celular por medio de gradientes de concentración que inducen la acumulación de leucocitos en los tejidos durante la inflamación;(38) estas moléculas intervienen en otras funciones, como la hematopoyesis, la angiogénesis o el control del crecimiento y el desarrollo celular. (39-42)

En concreto, a nivel ocular, las citocinas en general y quimiocinas en particular, juegan un papel esencial en la iniciación, mantenimiento y coordinación de los fenómenos inflamatorios oculares.

Se sabe que la composición de la lágrima varía al iniciar cualquier tipo de tratamiento tópico o sistémico, por lo que disponer de un medio objetivo capaz de evidenciar estas variaciones podrían

ayudar a conocer el estado de actividad inflamatoria de una manera objetiva y precoz, previa a la aparición de alteraciones estructurales intraoculares.

En los últimos años, se ha planteado la posibilidad de que existieran variaciones en los niveles de citocinas/quimiocinas en lágrima, lo cual ha sido demostrado en varios estudios llevados a cabo sobre pacientes. (38)

Una de las limitaciones más importante que se encontraban en el pasado para estudiar los niveles de citocinas era que, dado el pequeño volumen de lágrima que puede recogerse, usando las técnicas tradicionales de ELISA, sólo se podían cuantificar de 1 a 3 citocinas por muestra, lo que obligaba en muchas ocasiones a mezclar muestras procedentes de diversos pacientes. Sin embargo, el desarrollo reciente de nuevas tecnologías, como la Luminex® xMAP® multiplex platform, permite la detección simultánea de múltiples moléculas en volúmenes muy pequeños.

Mediante esta metodología, de desarrollo muy reciente se pueden medir múltiples moléculas en muestras individuales de lágrima, correlacionar las mediciones con datos clínicos individuales y obtener unos datos con mayor sensibilidad y reproducibilidad que con las técnicas de ELISA tradicionales.

Las citocinas lagrimales que se han involucrado en procesos inflamatorios son las siguientes (38-42):

\*La **interleucina 1 o IL-1**, históricamente fue una de las primeras citocinas descubiertas y cuyo gen se localiza en el cromosoma 2; es una citocina producida por múltiples estirpes celulares en respuesta al TNF- $\alpha$ , principalmente por los macrófagos, pero también por monocitos y células dendríticas. Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier otro tipo de agresión o estrés celular. Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria y sus efectos más relevantes son la síntesis de proteínas de fase aguda, neutrofilia y fiebre.

La interleucina-1 tiene acciones estimuladoras, así como inhibitoras, sobre diversos tipos celulares e incluso promueve la apoptosis. Entre sus funciones principales están:

- Tiene efectos proinflamatorios, producto de la liberación de histamina por mastocitos, causando vasodilatación y signos de inflamación localizada.
- Tiene actividad quimiotáctica sobre los granulocitos.
- Es un pirógeno, generando fiebre por liberación de prostaglandinas.
- Junto con IL-6 causa elevación de proteínas hepáticas de fase aguda, como el fibrinógeno o la proteína C reactiva.

- Actúa sobre el SNC produciendo sueño y anorexia durante procesos infecciosos; ese mismo efecto inhibe la contracción de la musculatura lisa de las arterias y del músculo cardiaco.
- Estimula la liberación de hormonas hipofisarias.
- Incrementa el número de células precursoras de la médula ósea.
- Promueve la expresión de los genes que la producen, así como de la síntesis de las prostaglandinas, leucotrienos, IL-8 y de ciertos protooncogenes como el c-fos y el c-jun.

\*La **Interleucina 5 o IL-5** es una interleucina producida por los linfocitos Th-2 y los mastocitos. El gen de la IL-5 está localizado en el cromosoma 11 próximo a los genes que codifican la IL-3, la IL-4 y el factor estimulante de crecimiento de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), todas ellas citocinas que son frecuentemente sintetizadas simultáneamente en las células Th2.

Sus funciones son la de estimular el crecimiento de las células B y la de aumentar la secreción de inmunoglobulinas (principalmente promueve la síntesis en grandes cantidades de IgA). Actúa también como mediador en la activación de los eosinófilos.

\*La **Interleucina 6 o IL-6** es secretada principalmente por linfocitos T y macrófagos, aunque se piensa que también por células endoteliales y otras células de los tejidos oculares.

Tiene acción proinflamatoria y constituye uno de los mediadores principales en la inflamación aguda y la respuesta innata ante un daño externo o una infección. Otras de sus funciones son participar en la activación de los macrófagos y en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas.

\*La **Interleucina-8 o IL-8** es una citocina de la familia de las quimiocinas, de naturaleza proinflamatoria. Su síntesis se realiza en fibroblastos, células endoteliales, monocitos y macrófagos.

Entre sus funciones destaca ser un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regular la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos, amplificando la respuesta inflamatoria local.

\*La **Interleucina-10 o IL-10**, también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citocinas (CSIF) tiene su origen en las células B.

Se trata de una citocina reguladora por excelencia, con propiedades antiinflamatorias, entre cuyas funciones principales está la de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos.

\*La **Interleucina-13 o IL-13** es una citocina no glucosilada de 132 aminoácidos producida por los linfocitos T.

Su principal función es la regulación de la actividad de los monocitos y las células B, ya que tiene la capacidad de modular la producción de IL-1, TNF e IL-8; también es capaz de estimular el crecimiento y la diferenciación de las células B, inhibir las células Th1, así como la producción de otras citocinas inflamatorias.

\*La **Interleucina-17 o IL-17** es una citocina proinflamatoria secretada por varios subtipos de células T activadas, aunque principalmente la sintetizan las células denominadas Th17, a las que ha dado nombre. Su receptor se encuentra en un amplio rango de tejidos.

Se le atribuyen diversas funciones biológicas, así, se la ha relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, con el rechazo de aloinjertos, en desarrollo del cáncer, como mediador en respuestas de hipersensibilidad inmediatas y tardías, y en el control de infecciones, entre ellas la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*.

\*La **Eotaxina**, es una citocina del grupo de la familia de quimoquinas C-C que tiene estructura glicoproteínica y un peso molecular de 8,3 KDa. Es producida principalmente por el endotelio activado, fibroblastos, macrófagos, células epiteliales bronquiales ciliadas y no ciliadas, músculo liso, condrocitos y eosinófilos.

Entre sus funciones se encuentra regular la conducta migratoria o quimioatracción y activación de eosinófilos en la inflamación alérgica y parasitaria. Para facilitar el movimiento de los eosinófilos, la eotaxina, en asociación con la IL-4, aumentaría la expresión endotelial de VCAM-1, una molécula de adhesión intracelular que permite la unión del eosinófilo al endotelio y su posterior transcitosis y extravasación.

\*La **Fractalquina/CX3CL1** es expresada sobretodo en células endoteliales y epiteliales activadas por sustancias proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Su receptor, el CX3CR1, se encuentra en células NK, linfocitos T citotóxicos y macrófagos.

Es una quimiocina con una estructura única, ya que difiere del resto en que tiene funciones tanto quimioatrayentes como de molécula de adhesión. Esto es posible ya que puede existir en 2 isoformas con diferente estructura: una soluble, con una potente función quimiotáctica y estimuladora de la migración de células inflamatorias; y otra, expresada en la membrana de las células que la sintetizan y con función de adhesión de estas células. Por todo ello juega un papel

importante en la regulación de los procesos inflamatorios oculares como en las uveítis anteriores y en las retinocoroiditis.

\*La quimiocina **RANTES/CCL5** es producida principalmente por los fibroblastos. Es un potente quimioatrayente para diversas poblaciones leucocitarias, y actúa como modulador de la respuesta inmune mediante la expresión de mediadores de la inflamación como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Una regulación inapropiada en la producción de estos mediadores puede dar lugar a inflamación crónica y fibrosis.

\*La quimiocina **IP-10 o proteína inducida por interferón** tiene como funciones principales inducir la quimiotaxis de las células T, NK, basófilos y eosinófilos.

\*El **factor de necrosis tumoral alfa o TNF- $\alpha$**  es una citocina glicoproteica formada por 185 aminoácidos, que procede de la hidrólisis de un propéptido de 212 aminoácidos. Algunas células sintetizan isoformas más cortas de la molécula. Genéticamente el gen del TNF está situado en la región del Complejo Principal de Histocompatibilidad (brazo corto del cromosoma 6; región 6p21).

Las funciones del TNF- $\alpha$  se deben a la unión de la citocina a 2 receptores celulares diferentes que se localizan en distintas células, como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Además, estos receptores pueden también encontrarse en estado soluble tanto en el suero como en el líquido sinovial. Aunque localmente los efectos del TNF- $\alpha$  son beneficiosos, cuando el TNF- $\alpha$  actúa de modo sistémico las consecuencias son desastrosas, provocando síndromes como el shock séptico o la coagulación intravascular diseminada.

Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares, como la IL-1 y las endotoxinas bacterianas. Además el TNF- $\alpha$  activa la producción de las interleucinas 1 a la 6.

Otras de sus funciones son aumentar la activación y adhesión plaquetaria favoreciendo la oclusión vascular, causante de necrosis tumoral, de donde proviene su nombre.

\*El **interferón gamma o IFN- $\gamma$** , también llamado interferón inmune o de tipo II, es un tipo de citocina producida por los linfocitos Th1 activados y NK. El interferón es una proteína producida naturalmente por el sistema inmunitario de la mayoría de los animales vertebrados como respuesta a agentes externos, tales como virus o células cancerígenas. En la mayoría de casos, la producción de interferón es inducida por otras citocinas, como IL-1, IL-2, TNF y GM-CSF, que son sintetizadas en respuesta a la aparición de sustancias extrañas al organismo. Su metabolismo y



excreción se produce principalmente en el hígado y el riñón. Difícilmente atraviesan la placenta y la barrera hematoencefálica.

Su función más importante es su participación en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria. Promueve la activación de macrófagos, de linfocitos T citotóxicos y de linfocitos NK. Pero además, ejerce una importante regulación inhibitoria de la respuesta celular Th2. Además, posee efectos antivirales y antitumorales, pero generalmente débiles.

**\*El factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos o GM-CSF** (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*); el gen del GM-CSF se ha mapeado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21-q32); que se transcribe constitutivamente en monocitos, fibroblastos y células endoteliales.

Su acción principal es modular la hematopoyesis, regulando la proliferación, diferenciación y capacidad funcional de los progenitores hematopoyéticos, con actividades frecuentemente superpuestas. Son, además, reguladores importantes de la respuesta inmune y de la homeostasis tisular, ya que, específicamente, induce la síntesis y liberación de IL-1 y TNF por los monocitos y macrófagos. Además se tiene evidencia de que el GM-CSF puede afectar la adhesión, agregación y movilidad de los neutrófilos in vitro e in vivo, sin embargo los mecanismos por los cuales ejerce este efecto no están completamente entendidos.

**\*El factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*) es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis. Su producción puede inducirse en células que no están recibiendo suficiente oxígeno. Cuando una célula es deficitaria en oxígeno, produce el factor de transcripción HIF (*hypoxia-inducible factor*) que estimula la liberación de VEGF; este VEGF circulante se une a los receptores de VEGF en las células endoteliales, desencadenando la activación de la cascada que conduce a la angiogénesis. El VEGF incluye las proteínas homodiméricas VEGF-A (que es la que se designa normalmente al hablar de VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PIGF (*placental growth factor*).

Como su propio nombre indica, las acciones del VEGF han sido estudiadas en las células del endotelio vascular, aunque también tiene efectos sobre otros tipos celulares; así, por ejemplo, estimula la migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales y células tumorales. In vitro, se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. El VEGF, también, es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular, y por esta función originalmente recibía el nombre de factor de permeabilidad vascular (*vascular permeability factor*).

## 2.B.4. Sistema Inmunitario de la Mucosa Ocular

Al igual que ocurre en otras mucosas, en la conjuntiva ocular numerosos investigadores han demostrado la existencia de un sistema inmunitario asociado a toda la Superficie ocular,(43-46) denominado sistema inmunitario de la mucosa ocular, ocular mucosal immune system cuyo acrónimo es OMIS, o tejido linfoide asociado al ojo, eye-associated lymphoid tissue o EALT, que actuaría como una unidad anatómica y funcional protegiendo de manera coordinada la mucosa ocular; esta unidad englobaría al tejido linfoide asociado a la conjuntiva, conjuntiva-associated lymphoid tissue o CALT, al tejido linfoide asociado al sistema de drenaje lagrimal, lacrimal drainage-associated lymphoid tissue o LDALT y al tejido linfoide asociado a la glándula lagrimal, lacrimal gland-associated lymphoid tissue o LGALT. Figura 8

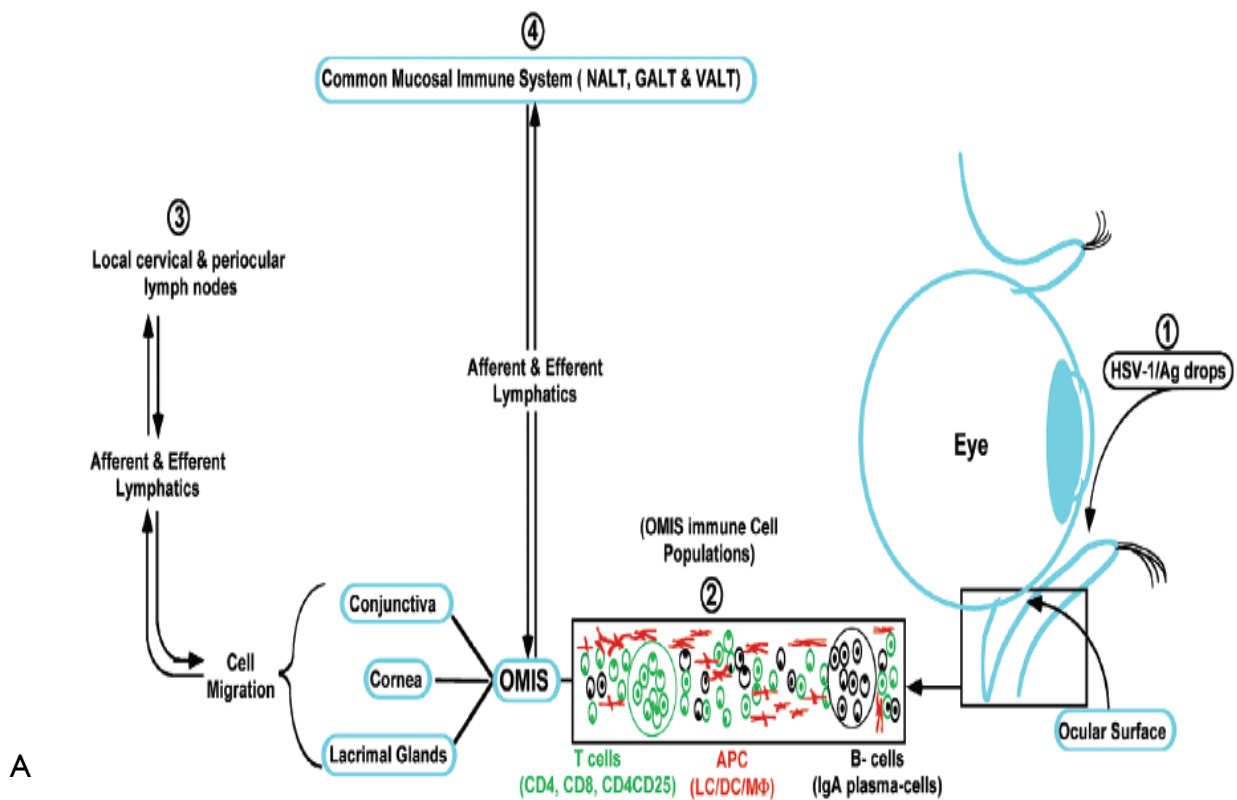


Figura 8. Sistema Inmunitario asociado a la mucosa ocular:

A- Sistema Inmunitario de la mucosa ocular (44)

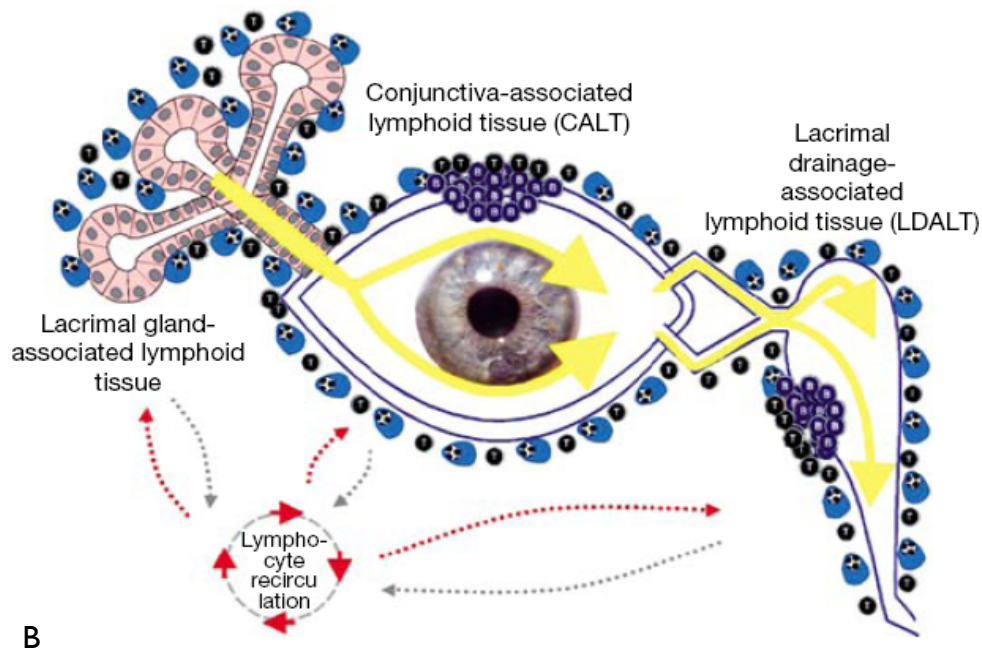


Figura 8. Sistema Inmunitario asociado a la mucosa ocular:

B- Tejido linfoide asociado al ojo (44)

### 2.B.4.1. Tejido linfoide asociado a la conjuntiva

Una de las principales funciones de la conjuntiva consiste en la protección frente a posibles infecciones microbianas y/o ataques externos, para lo cual cuenta con una amplia gama de células inmunes ligadas a esta mucosa, es decir, un tejido linfoide asociado a la conjuntiva o *CALT*, que le va a proporcionar toda una serie de mecanismos de defensa, tanto innatos como adaptativos, para mantener íntegra la SO. (47)

Numerosos autores han descrito que el *CALT* se encuentra formado tanto por tejido linfoide organizado, compuesto por folículos linfoides, donde predominan las células B, como por tejido linfoide difuso, principalmente compuesto por linfocitos T y células plasmáticas productoras de IgA, distribuidos arbitrariamente entre el epitelio (linfocitos intraepiteliales o *IELs*), y el tejido conectivo subyacente, formado por linfocitos de la lámina propia. (47-49)

Se ha demostrado que la densidad de estas células varía en función de la zona conjuntival observada, como queda reflejado en un trabajo realizado por Knop and Knop (50) en distintas zonas topográficas de la conjuntiva humana. Otro aspecto ampliamente demostrado es que la mayor parte de los *IELs* de la conjuntiva humana son linfocitos T ( $CD3^+$ ) con un claro predominio de los linfocitos T citotóxicos ( $CD3^+CD8^+$ ) sobre los linfocitos T cooperadores ( $CD3^+CD4^+$ ); sin

embargo, estos autores también destacan que existe una distribución inversa en los linfocitos de la lámina propia. (50-52)

Históricamente se ha descrito que la mayor parte de estas células inmunes son productoras de citocinas pro y anti-inflamatorias, tanto de tipo Th1: IL-2, IFN- $\gamma$ ; como Th2: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13; sin embargo, no son las únicas con este rol, ya que cada vez es mayor el número de trabajos en los que se demuestra que las células epiteliales conjuntivales también son capaces de secretar diversas citocinas, como la IL-4, IL-13 o el TGF- $\beta$ , implicándose directamente en la iniciación y propagación del fenómeno inflamatorio. (53-55)

Con todo esto se evidencia que la conjuntiva, o mejor dicho el *CALT*, juega un papel crucial en los mecanismos defensivos de la SO humana, estando presente no sólo cuando tiene lugar el proceso inflamatorio, sino de forma regular. Así queda reflejado en publicaciones recientes de Reinoso et al (5) donde se describe tanto la distribución en conjuntiva de sujetos sanos de IELs como su capacidad proliferativa; el conocimiento de esta distribución topográfica (Figura 9) en sujetos sanos nos puede ser de gran ayuda a la hora de entender la respuesta de nuestros pacientes ante tratamientos tópicos que pueden alterar, en mayor o menor profundidad, las distintas capas de la conjuntiva humana en función de su penetración; ya que, según refleja esta publicación, las células localizadas en conjuntiva tarso-bulbar inferior (linfocitos B y CD4+) podrían actuar como el sitio de inducción inmune, mientras que las localizadas en conjuntiva tarso-bulbar superior (linfocitos CD8+) actuaría como sitio efector ante agentes víricos/bacterianos. (5)

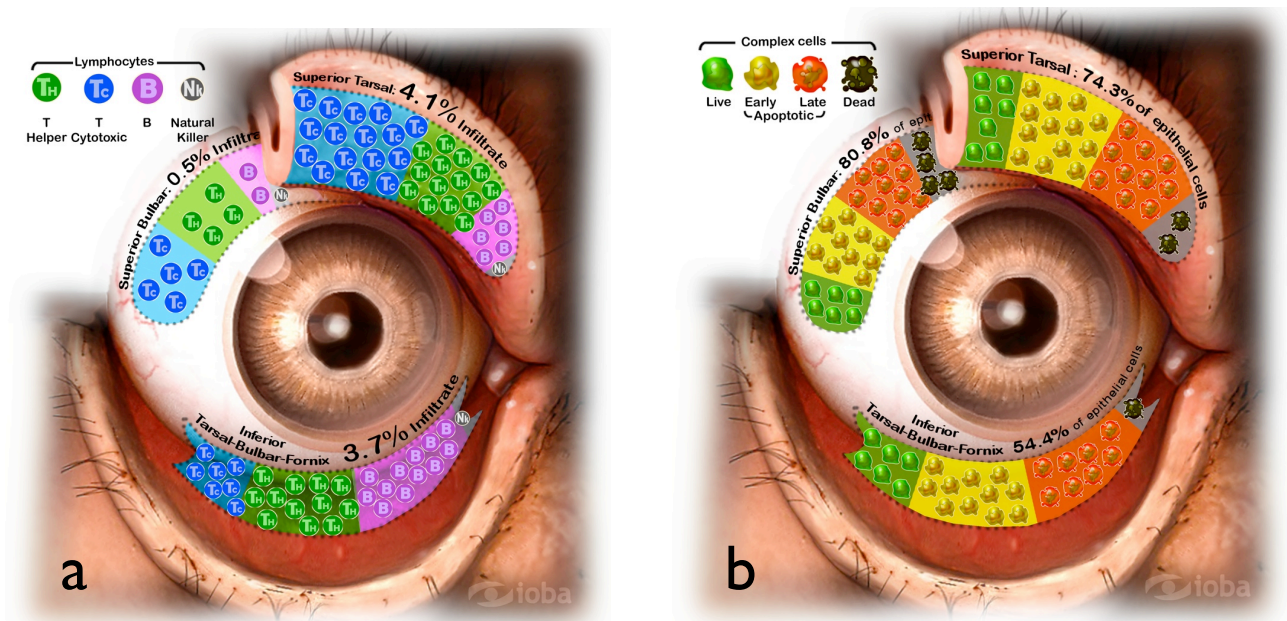


Figura 9. Distribución topográfica IELs en conjuntiva humana sana. a) Proporción de Th, Tc, células B y NK; b) proporción de células complejas vivas, muertas, apoptosis temprana y tardía;

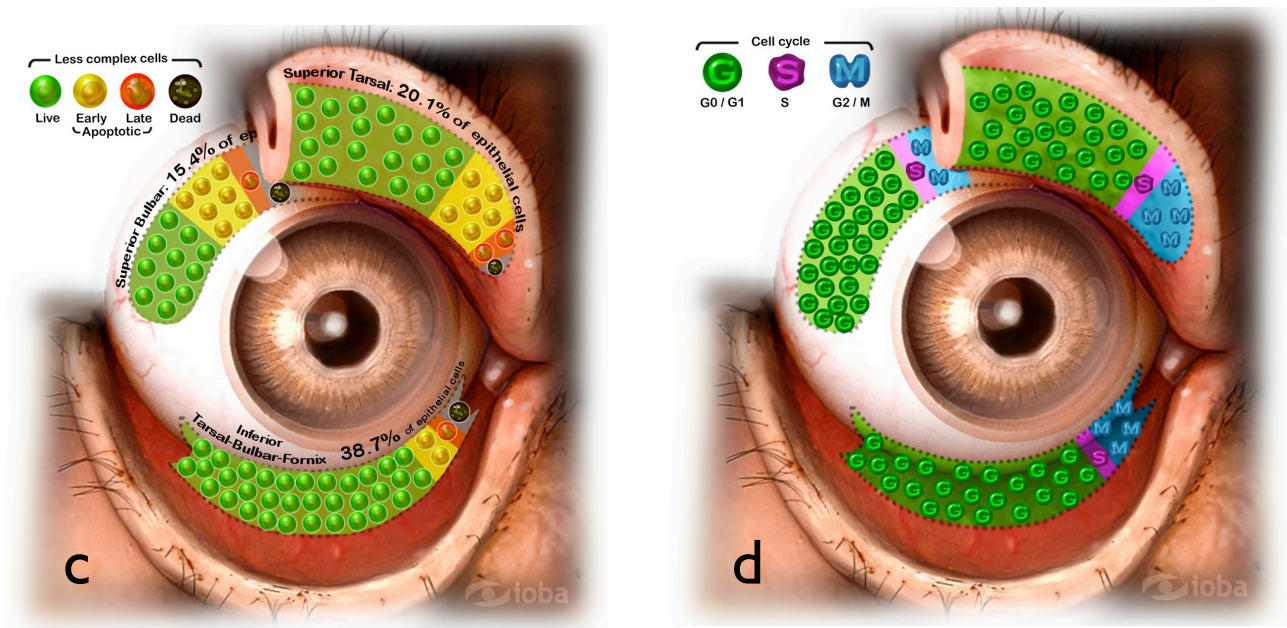


Figura 9. Distribución topográfica IELs en conjuntiva humana sana. c) Proporción de células simples vivas, muertas, apoptosis temprana y tardía; d) proporción de células en fase G0/G1, S y G2 del ciclo celular. (5)



# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

# **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **3.A. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Este ensayo se realizó previa obtención del consentimiento informado según la Declaración de Helsinki, y previa aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Se trata de un estudio prospectivo, controlado, simple ciego, de un año de duración.

El estudio se realizó considerando independientes ambos ojos de cada paciente, con el fin de obtener una población más amplia.

### **3.A.1 SUJETOS**

El estudio se ha realizado en 30 pacientes (cincuenta y cuatro ojos), divididos en dos grupos, pertenecientes a pacientes que visitaron la Unidad de Glaucoma del Departamento de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), y que a criterio de los oftalmólogos responsables de dicha unidad precisaron tratamiento hipotensor.

Fueron divididos en un grupo I (GI) si precisaron tratamiento hipotensor con un colirio de Brimonidina (Alphagan®, Allergan SAE, España), o en un grupo II (GII) si precisaron tratamiento con la combinación de Brimonidina + Maleato de Timolol 0.5% (Combigan®, Allergan SAE, España). La decisión de tratar con uno u otro fármaco estuvo basada en criterios médicos en función del estado evolutivo del glaucoma/HTO de cada paciente.

El número de pacientes fue de 15 ( 25 ojos) en el grupo I, y de 17 ( 29 ojos) en el grupo II. La distribución en ambos grupos no fue randomizada, ya que la inclusión, en uno u otro grupo, dependió de las indicaciones médicas de cada paciente.

#### **A) Criterios de inclusión**

Que los pacientes entendieran y firmaran el consentimiento informado.

Que los pacientes cumplieran los criterios diagnósticos y terapéuticos de la unidad de glaucoma del HCUV(atendiendo a los niveles de PIO, daño en nervio óptico y alteración en campo visual).

Compromiso por parte del paciente de mantener el tratamiento al menos durante 12 meses.

Edad comprendida entre 40-85 años, con independencia de sexos.

En caso de que el paciente estuviese recibiendo tratamiento tópico previo con otro fármaco, se le sometió a un periodo de “lavado” (retirada del tratamiento tópico) de 2 semanas.

Compromiso por parte del paciente de acudir a las revisiones establecidas.

## **B) Criterios de exclusión**

Recibir tratamiento sistémico con hipotensores arteriales.

Tener al menos una de las contraindicaciones para el tratamiento con  $\alpha_2$  agonistas, como son: tratamiento con IMAOS o antidepresivos tricíclicos, padecer arritmias, taquicardias, hipertensión arterial o ser afáquico.

Tener contraindicaciones para el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes, como son padecer asma, EPOC, insuficiencia cardiaca, bloqueos cardiacos, bradicardias o diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM).

Presentar inflamación o enfermedad de la cámara anterior o de la superficie ocular tales como: queratitis crónicas o conjuntivitis crónicas, de cualquier etiología, incluyendo el síndrome de ojo seco.

Estar recibiendo cualquier tratamiento con fármacos para otros síntomas oculares distintos a los del estudio, incluidas las lágrimas artificiales.

Usar lentes de contacto o haber sido sometido a cirugía ocular previa en los últimos 6 meses.

Incapacidad de seguir las pautas de revisión.

## **C) Criterios para abandonar el estudio**

Cuando el paciente así lo desee, sin tener que dar ninguna explicación al respecto.

Si por algún motivo el paciente suspendió el uso de los colirios prescritos durante más de un mes.

Aparición de patología ocular incompatible con el uso del tratamiento prescrito.

Incumplimiento de alguno de los criterios de inclusión durante el seguimiento.

Cumplimiento de alguno de los criterios de exclusión a lo largo del estudio.



### 3.A.2 SECUENCIA DE LA EXPLORACION

En todas las visitas se siguió el siguiente orden para la exploración de los sujetos:

(Tabla 3, Figura 10 y Anexo 1)

3.A.2.1. Historia clínica personal

3.A.2.2. Encuesta clínica estandarizada. *Symptoms of discomfort questionnaire (Allergan protocol)*

3.A.2.3. Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo (NIBUT)

3.A.2.4. Recogida de lágrima para la cuantificación de la concentración de lisozima lagrimal

3.A.2.5. Test de Schirmer con anestesia

3.A.2.6. CIC para determinar la expresión de los genes de receptores alfa 2 adrenérgicos

3.A.2.7. CIC para análisis mediante microscopía óptica

3.A.2.9. *Brush* conjuntival

3.A.2.10. Biomicroscopía de Polo Anterior

-Tinción con fluoresceína (escala Oxford) y rosa de Bengala (escala Van Bijstervald)

-Toma de PIO

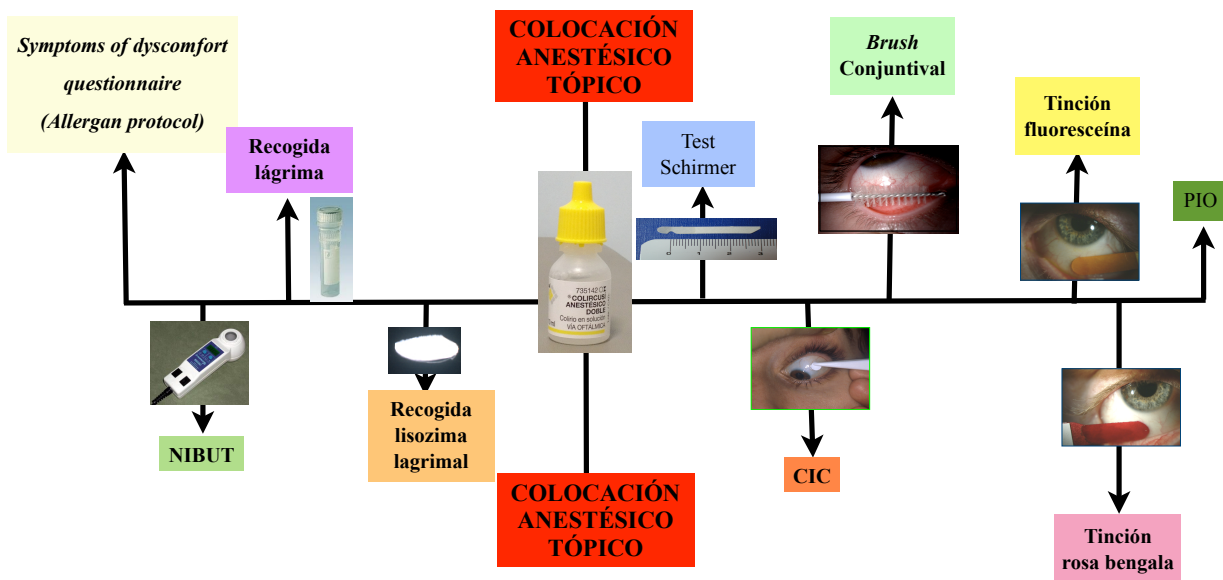


Figura 10. Secuencia exploración realizada en las visitas del estudio (Elaboración propia)

### **3.A.3 PAUTA DE VISITAS**

La pauta de visitas que se estableció para llevar a cabo el estudio fue la siguiente:

#### **3.A.3.1. VISITA 0. SELECCIÓN DE SUJETOS**

Todo los sujetos candidatos a ser incluidos en el presente estudio, antes de que iniciasen tratamiento alguno, fueron sometidos a una exploración oftalmológica en el orden que se ha detallado en el apartado anterior.

Todos aquellos sujetos, que tras el examen obtuvieron una puntuación mayor a 4 puntos en la tinción con rosa de Bengala, un NIBUT menor de 10 segundos y/o un test de Schirmer con anestesia menor de 5 mm, fueron excluidos del estudio por sospecha de patología de superficie ocular que pudiera enmascarar el resultado final.

En el resto de casos, los datos obtenidos tras el estudio se tomaron como control para compararlos con las medidas tomadas en las siguientes revisiones, una vez iniciado el tratamiento con colirios tópicos.

#### **3.A.3.2. VISITAS 1-4. SEGUIMIENTO DE LOS SUJETOS**

Una vez iniciado el tratamiento con el colirio seleccionado, y después de que los pacientes lo hubiesen utilizado de modo habitual según pauta médica (1 gota cada 12 horas), acudieron a revisiones de acuerdo con el siguiente esquema:

- Visita 1: a los 3 meses.
- Visita 2: a los 6 meses.
- Visita 3: a los 9 meses.
- Visita 4: a los 12 meses.

En todas estas revisiones se realizaron las pruebas detalladas en la secuencia de exploración, y los datos obtenidos fueron anotados en la hoja de recogida de datos realizada para tal efecto (Tabla 3, Figura 10 y Anexo 1). Aunque en todas las revisiones se realizaron todas las pruebas, el análisis de las muestras en laboratorio para citocinas en lágrima, CIC para estudio por microscopía óptica y ARNm de receptores alfa-2 adrenérgicos sólo se realizó en las visitas 1 y 4.

Tabla 3. Pruebas realizadas y secuencia de exploración en los sujetos del estudio

(Elaboración propia)

PRUEBAS	VISITA 0	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	VISITA 4
	INCLUSIÓN	3 MESES POST-TRATAMIENTO	6 MESES POST-TRATAMIENTO	9 MESES POST-TRATAMIENTO	12 MESES POST-TRATAMIENTO
CONSENTIMIENTO INFORMADO	X				
HISTORIA CLÍNICA PERSONALIZADA	X	X	X	X	X
ENCUESTA CLÍNICA ESTANDARIZADA. <i>Symptoms of discomfort questionnaire (Allergan protocol)</i>	X	X	X	X	X
NIBUT	X	X	X	X	X
LÁGRIMA	X				X
LISOZIMA	X	X	X	X	X
TEST DE SCHIRMER CON ANESTESIA	X	X	X	X	X
CIC PARA RNA RECEPTORES ALPHA-2 ADRENERGICOS	X				X
CIC PARA ANALISIS POR MICROSCOPIA OPTICA	X				X
BRUSH CONJUNTIVAL	X	X	X	X	X
BPA: TINCIÓN CON FLUORESCINA Y ROSA DE BENGALA	X	X	X	X	X
TOMA PIO	X	X	X	X	X

### **3.B. PRUEBAS REALIZADAS**

En todos los sujetos del estudio se analizaron una amplia colección de variables, que describiremos a continuación englobadas en dos grandes grupos, denominados variables clínicas y variables de laboratorio.

#### **3.B.1. VARIABLES CLÍNICAS**

##### **3.B.1.A. Historia Clínica personal**

Previa a la obtención de las muestras se realizó, en cada una de las visitas, una breve anamnesis a los sujetos que participaron en el estudio para descartar cualquiera de los criterios de exclusión del estudio y comprobar que se seguían cumpliendo los de inclusión.

### 3.B.1.B. Encuesta Clínica Estandarizada. *Symptoms of Discomfort Questionnaire (Allergan Protocol)*

Todos los sujetos completaron, en cada una de las visitas, dicha encuesta; el análisis de cada una de las respuestas de la encuesta se realizó de forma individual; siendo el valor final, para cada sujeto, el resultado de la suma de todas sus respuestas. (56-58) Tabla 4

Tabla 4. *Symptoms of Discomfort Questionnaire (Allergan Protocol)*

1-Sequedad	Escala de puntuación: 0= no he sentido el síntoma 1= rara vez he sentido el síntoma, pero no es molesto 2= alguna vez he sentido el síntoma, me causa molestias pero no interfiere en mis actividades 3= siempre siento este síntoma, me causa molestias pero no interfiere en mis actividades 4= siempre siento este síntoma, me causa molestias y además interfiere en mis actividades
2-Sensación de cuerpo extraño en el ojo	
3-Quemazón/ escozor	
4-Dolor	
5-Picor	
6-Sensibilidad a la luz	
7-Visión borrosa	
8-Otros (especificar)	
TOTAL (1+2+3+4+5+6+7+8)	

### 3.B.1.C. Medida del Tiempo de Ruptura Lagrimal No Invasivo (NIBUT)

Para la medición del NIBUT se utilizó el *Tearscope Plus®* (Keeler, Windsor, Berkshire, Inglaterra).

Se registró el tiempo (medido en segundos) que tardaba en aparecer la primera disrupción en uno de los anillos proyectados sobre la PL a nivel corneal.

### 3.C.1.D. Test de Schirmer con anestesia

Después de instilar dos gotas de tetracaína (Colircusí Anestésico 0,50%, Alcon Cusí, Barcelona, España) en el fórnix conjuntival del ojo en estudio, separadas un intervalo de un minuto, se esperaron 2-3 minutos y con la punta de un pañuelo de papel se secó el exceso de lágrima del fondo de saco conjuntival. Se utilizaron tiras de filtro estandarizado de 5x35 mm (Alcon Laboratories, INC, Fort Worth, Texas, EEUU).

Con una regla, se evaluó la humectación en mm (tras 5 minutos de permanecer la tira de filtro en la unión del tercio externo con los dos tercios internos del borde palpebral, mientras el sujeto mantenía los ojos cerrados), como se muestra en la Figura 11. (59)



Figura 11. Evaluación del Test de Schirmer (59)

### **3.B.1.E. Biomicroscopía de Polo Anterior. Tinciones con fluoresceína y rosa de Bengala**

Se valoró la integridad de la superficie ocular mediante la exploración con lámpara de hendidura.

Para la tinción con fluoresceína se utilizaron tiras de papel impregnadas con fluoresceína (Fluorets, Chauvin, Aubenas, Francia) que fueron humedecidas con suero fisiológico (Suero fisiológico ClNa 0,9% 10 ml, B/Braun, Barcelona, España).

Pasados unos 2-3 minutos de la instilación, se evaluó la tinción en la lámpara de hendidura con filtro azul cobalto y se graduó de 0 a 5 puntos la córnea y la conjuntiva utilizando la escala de Oxford. (56,60,61) Figura 12

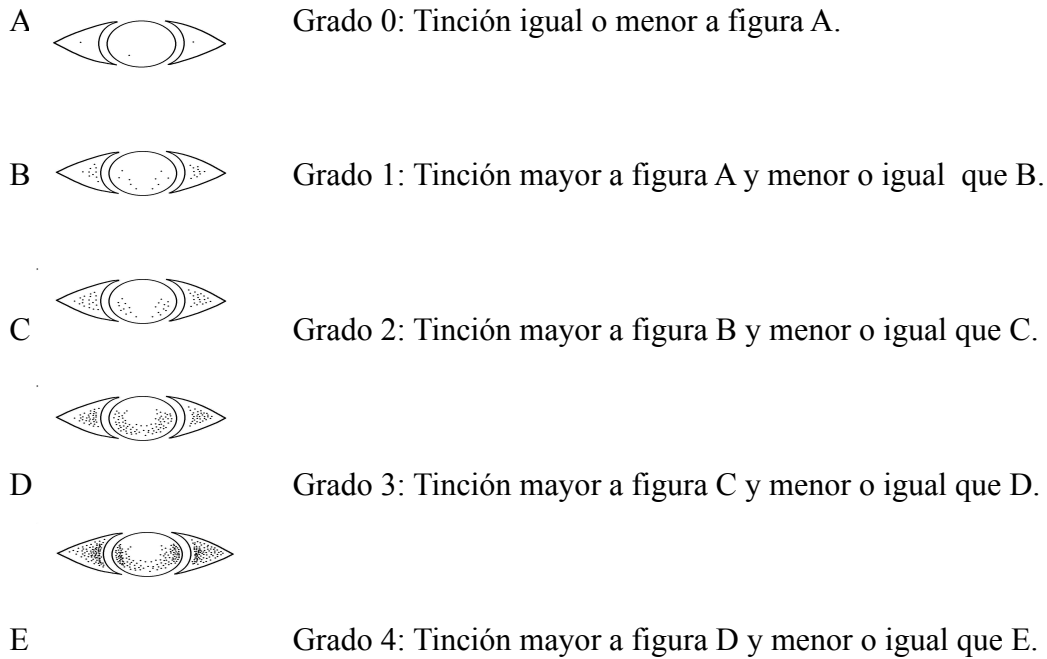


Figura 12. Escala de Oxford (61)

Para la tinción con rosa de Bengala, se utilizaron tiras de papel impregnadas con rosa de Bengala (Rose Bengal strips 1,3 mg, Akorn Inc, Illinois, EEUU) que fueron humedecidas con suero fisiológico (Suero fisiológico CINA 0,9% 10 ml, B/Braun).

Pasados unos 2-3 minutos de la instilación, se evaluó la tinción en la lámpara de hendidura con luz anerita y se puntuó de 0 a 3 puntos cada zona estudiada (córnea, conjuntiva bulbar nasal y temporal) en función de la intensidad de la tinción utilizando la escala de van Bijsterveld, sumándose las 3 zonas para obtener un valor definitivo. (56, 68-62) Figura 13

Graduación de Van Bijsterveld

Conjuntiva bulbar temporal		Área corneal				Conjuntiva bulbar nasal					
A		B				C					
A		B				C					
0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Puntuación global = A + B + C =											
Valore el puntuado utilizando la escala de 0 a 3 0= Sin puntos coloreados      2= Zonas coloreadas bien definidas 1= Presencia de algunos puntos      3= Coloreado total											

Figura 13. Escala de van Bijsterveld (62)

### **3.B.1.F. Toma de PIO**

Tras la instilación de la fluoresceína y del rosa de Bengala, se realizó la toma de PIO con un tonómetro de aplanación manual tipo Perkins (Perkins Mk2.HS Clement Clarke International Ltd, Edinburgh Way, Harlow, UK).

## **3.B.2.VARIABLES DE LABORATORIO**

### **3.B.2.A. Determinación de la concentración de lisozima**

#### **-Toma de la muestra**

De modo previo a la instilación de colorantes o anestésico se recogió la muestra para el análisis de lisozima lagrimal. Se insertó un papel de filtro de 5 mm de diámetro en el fondo de saco inferior durante un minuto, pidiendo al paciente que durante ese tiempo tuviese los ojos cerrados; se recogieron 10µl de lágrima en el filtro, y éste se depositó en un tubo *Eppendorf* vacío y estéril, conservándose la muestra a -20 °C hasta su análisis en el laboratorio.

#### **-Cuantificación de la concentración de lisozima**

La cuantificación de la lisozima lagrimal se realizó mediante la técnica de inhibición de micrococcus sobre placas de agar, midiendo el diámetro/radio del anillo de lisis.

Con cada una de las muestras realizamos el siguiente protocolo:

Se pesaron 1.9 gramos de agar y se metieron en un frasco. Luego se añadió 50 ml de agua destilada en este frasco y se agitó suavemente con la mano. Se colocó sobre el frasco un trocito de adhesivo de autoclave y se esterilizó. Mientras el frasco se esterilizaba, se encendió la cabina de flujo laminar ASB95 del Laboratorio D-224, se limpió (con alcohol de 70°) y se introdujo un bote con lejía diluida. Mientras se sacó del congelador del frigorífico Liebherr del laboratorio el micrococcus lysodeikticus y la lisozima, para que se atemperaran.

Se identificaron 5 eppendorf, uno para el micrococcus y el resto para: LZ 10000, LZ 1000, LZ 100 y LZ10. En el eppendorf que hemos nombrado LZ10000 se pesaron 0.0020 gramos (2 mg) de Lisozima y posteriormente se diluyeron con 200 µl de PBS estéril, y se vortearon hasta homogeneizar. Alcanzando una concentración final de 10000 µg/mL. En los eppendorf LZ 1000, LZ 100 y LZ10 se añadieron 180 µl de PBS estéril y se hicieron diluciones seriadas de la lisozima de la siguiente manera: se pasaron 20 µl del eppendorf LZ10000 al eppendorf LZ1000 (que contiene 180 µl) y se homogeneiza con vortex, logrando una concentración 1000 µg/mL. Luego se pasó 20 µl del eppendorf LZ1000 al eppendorf LZ100 (que contiene 180 µl) y se volvió a homogeneizar con vortex, logrando una concentración 100 µg/mL; por último, se pasó 20 µl del eppendorf LZ100 al

eppendorf LZ10 (que contiene 180 µl) y se volvió a homogeneizar con vortex, logrando una concentración definitiva de 10 µg/mL.

En el eppendorf que hemos nombrado Micrococcus se pesaron 0.005 gramos (5 mg) de *Micrococcus lysodeikticus* y posteriormente se diluyeron con 500 µl de PBS estéril, y se vortearon hasta homogeneizar, asegurándonos de no sacar con la misma parte de la varilla la lisozima y el micrococcus.

Una vez hechas las diluciones, se puede sacar del autoclave el medio de cultivo (agar) esterilizado y meter en la cabina. se marca la placa de petri en la cual se van a poner los discos (asegurándonos de que en cada placa haya un máximo de 6 discos) y se numera la placa (no la tapa) para cuando pongamos los discos tenerlos perfectamente identificados. La placa debe escribirse por la parte exterior, ya que, la placa por dentro no se puede tocar. De vez en cuando agitar suavemente el frasco de agar para que no se solidifique.

Los 500 µl del micrococcus diluido que están en el eppendorf se tienen que echar en un falcon de 15 ml que contenga 4.5 ml de PBS estéril, se homogeniza bien en el vortex y se cogen 500 µl de esta dilución y se dispensan en el frasco donde tenemos el agar esterilizado a una temperatura +/- de 37°C. Inmediatamente se echa el agar en la placa o placas (dependiendo de las muestras que haya), y con 50 ml se rellenan 2 placas; se deja la tapa medio abierta para que la tapa no se empañe con el calor del agar y este se solidifique. Cuando el agar este solido se empieza a poner los discos sobre él. Para ello se coge un disco estéril y se impregna en el líquido del eppendorf LZ10, a continuación se pone en el agar en la posición que le hemos nombrado. Luego se coge otro disco y se impregna en el eppendorf LZ100, a continuación se pone en el agar. Así realizamos este mismo paso para las concentraciones LZ1000 y LZ10000. Una vez puestos los estándares se comenzó a poner los discos de los pacientes remitidos para cada visita, asegurándonos de poner siempre poniendo el disco del ojo izquierdo primero en el agar y luego el ojo derecho. Tras esto se guardaron las placas boca abajo en la estufa M-200 del laboratorio a 37°C y dejaron 24 horas.

Transcurridas las 24 horas, se procedió a la medida de los anillos de precipitación para obtener el resultado: en la base de datos DiagnosticosClinicosDefinitiva (CAMBIO iNMUNOLAB).mdb abriendo el formulario Lisozima. Figura 14



Fecha del informe:	27/01/2011	
Fecha de la toma de la muestra:	24/01/2011	
Dr. que remite:		
<b>CURVA PATRÓN:</b>		
10 µg/ml lisozima		6
100 µg/ml lisozima		11
1000 µg/ml lisozima		18
10000 µg/ml lisozima		24
<b>Haga clic aquí para calcular la recta patrón</b>		
Pendiente		6.10
Término independiente		-0.50
<b>PACIENTES:</b>		
HC:	9575	
OD:	20,5	2.771
OI:	19	1.573
HC:	10408	
OD:	19,5	1.900
OI:	19	1.573

Figura 14. Pantalla de entrada de datos del Formulario Lisozima (Fuente: IOBA)

Con los resultados de las diluciones conocidas de lisozima se calculó la recta patrón; y a partir de la recta patrón, se calcularon los resultados de las muestras de los pacientes, una vez introducidos el diámetro de los halos de sus discos.

### 3.B.2.B. Citología por impresión conjuntival

#### 3.B.2.B.1. Citología por impresión conjuntival para microscopía óptica

##### -Toma de la muestra

Se realizó la toma de muestras tras la instilación de dos gotas de tetracaína (Colircusí Anestésico® 0,50%) en el fondo de saco conjuntival del ojo a estudio. Se emplearon papeles de filtro de polietersulfona (PES) (Supor® Membrane disc filters. Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, Michigan, EEUU) de 4x5 mm y de 0,2 micras de tamaño de poro. Los especímenes fueron recogidos de la conjuntiva bulbar inferior del ojo a estudio, a unos 4 mm del limbo, mediante unas pinzas de plástico estéril, tras realizar sobre ellos una leve presión. Los filtros se introdujeron en un tubo *Eppendorf* con alcohol de 96°, para su posterior procesamiento mediante la técnica de PAS-Papanicolau y valoración mediante el estadiaje de Nelson de las células epiteliales no caliciformes.

### **-Tinción PAS-Papanicolau**

Los filtros de PES que habían sido obtenidos mediante Citología por impresión conjuntival (CIC) en las sucesivas visitas, fueron procesados mediante un protocolo modificado de la tinción PAS-Papanicolau. (63)

- Fijación: Alcohol 96%, 3 minutos.
- Hidratación: Alcohol 70%, 2 minutos.  
Agua destilada, 2 cambios rápidos.
- Tinción: Ácido periódico 0,05%, 2 minutos.  
Agua destilada, 2 cambios rápidos.  
Reactivo de Schiff, 2 minutos.  
Metabisulfito sódico 0,5%, 2 minutos.  
Agua destilada, 2 cambios rápidos.  
Giemsa, 1 minuto.  
Agua destilada, 8 minutos.
- Deshidratación: Alcohol 95%, 1 minuto.  
Alcohol absoluto, 4 minutos.  
Xileno, mientras se monta.

### **-Cuantificación mediante Estadaje de Nelson**

Todas las citologías fueron estudiadas y clasificadas por el mismo observador, desconociendo éste el paciente y el número de visita de la que se trataba; se evaluaron de 8 a 10 campos con 400 aumentos (microscopio óptico Olympus BH-2MDO, Olympus, Tokio, Japón).

Las células epiteliales fueron clasificadas según el estadaje de Nelson (Figuras.15-19); Se registró también la aparición de condensaciones en la cromatina nuclear en forma de serpiente (*snakes*) según el porcentaje relativo a las células epiteliales. (63,64)

### **Grado 0**

Células epiteliales pequeñas y redondas, con citoplasma eosinofílico. Núcleos basófilos y grandes con una relación núcleo/citoplasma 1/2 . Figura 15

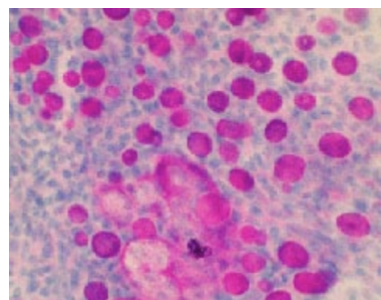


Figura 15. Grado 0 de Nelson

### **Grado 1**

Células epiteliales un poco mayores y poligonales, con citoplasma eosinofílico. Núcleos basófilos con una relación núcleo / citoplasma 1/3. Figura 16

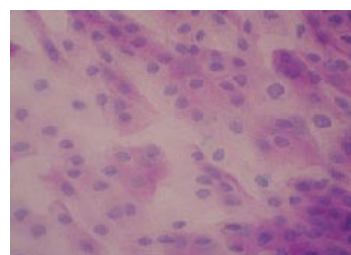


Figura 16. Grado 1 de Nelson

### **Grado 2**

Células epiteliales grandes y poligonales, con citoplasma de tinción variable. Núcleos basófilos con una relación núcleo / citoplasma 1/4-5, y en ocasiones células multinucleadas. Figura 17

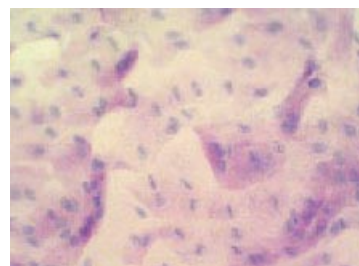


Figura 17. Grado 2 de Nelson

### **Grado 3**

Células epiteliales grandes y poligonales, con citoplasma basófilo. Núcleos basófilos con una relación núcleo / citoplasma <1/6. Figura 18

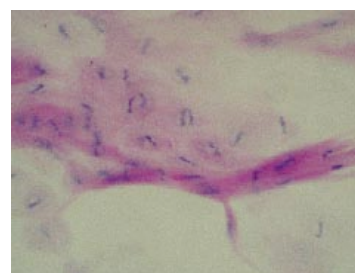


Figura 18. Grado 3 de Nelson

### **Snakes**

Presencia de condensaciones de la cromatina nuclear en forma de serpiente (*snakes*) clasificados según el porcentaje relativo a las células epiteliales.

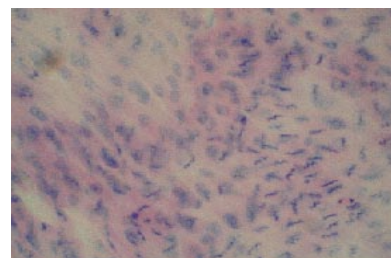
Figura 19

Grado 0 (0%), Grado 1 (1-10%),

Grado 2 (11-25%), Grado 3 (26-50%),

Grado 4 (51-75%), Grado 5 (>75%)

Figura 19. Snakes



Figuras. 15-19. Estadaje de Nelson (63,64)

### **3.B.2.B.2. Citología por Impresión Conjuntival para cuantificación de los genes de los receptores alfa-2 adrenérgicos**

#### **-Toma de la muestra**

Las muestras se obtuvieron, tras instilación de dos gotas de tetracaína (Colircusí Anestésico® 0,50%.) en el fondo de saco conjuntival del ojo a estudio. Se emplearon papeles de filtro de polietersulfona (PES) (Supor®.) de 4x5 mm y de 0,2 micras de tamaño de poro. Los especímenes fueron recogidos de la conjuntiva bulbar temporal superior e inferior de los ojos a estudio, a unos 4 mm del limbo, mediante unas pinzas de plástico estéril, tras realizar sobre ellos una leve presión, y se introdujeron posteriormente en un criotubo que contenía 1 ml de tampón de lisis RLT y 2-mercaptoetanol. El criotubo se guardó a -80°C hasta su posterior análisis.

#### **-Aislamiento del ARN**

Para el aislamiento del ARN total de las muestras se utilizó el kit de extracción comercial *RNeasy® Mini Kit* de Qiagen. El proceso fue llevado según las instrucciones del fabricante y como se resumen a continuación. (65)

En primer lugar se realizó la recogida y homogeneización de las muestras. La homogeneización de las muestras es necesaria para reducir la viscosidad causada por componentes celulares de elevado peso molecular o restos celulares. Para ello, se colocaron las muestras en una columna Qiashredder, que contiene un polímero sintético de fibras cortantes con efecto triturador, introducida en un tubo colector de 2ml, y se centrifugó durante 2 minutos a 15.000 g. Una vez homogeneizadas las muestras, se añadieron 700 µl de etanol al 70% al eluido para ajustar las condiciones óptimas de unión. De esta mezcla se pasaron 700 µl a la columna RNA easy-mini

columna, en la que el ARN total se une a la membrana de silica gel de la columna, introducida en un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó un pulso a 9.000 g y se desechó el eluido. Así se consigue que el ARN quede adherido a la columna de cromatografía. Posteriormente, se procedió a lavar la columna tres veces. Primero se añadieron 700 µl de tampón RW1 (RNA easy® Mini Kit, que contiene etanol) y se centrifugó a 9.000 g durante 30 segundos; después se añadieron 500 µl de tampón RPE (RNA easy® Mini Kit) y se centrifugó a 9.000 g durante 30 segundos. Por último, se pipetearon otros 500 µl de tampón RPE y se centrifugó a 15.000 g durante 30 segundos. Con objeto de secar las membranas de las columnas, se centrifugaron a 15.000 g durante 1 minuto. Para eluir el ARN enlazado en dicha membrana, se añadieron 100 µl de agua libre de RNAsas, se incubó durante 10 minutos y se centrifugó a 9.000 g durante minuto. El ARN fue guardado a -80°C hasta su uso. Figura 20

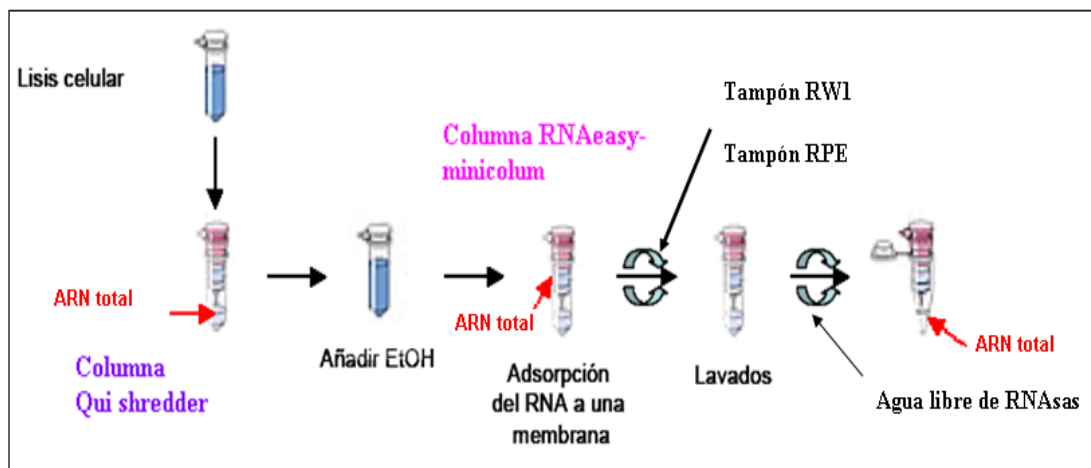


Figura 20. Proceso de extracción del ARN total de las muestras, utilizando el kit de extracción comercial RNA easy® Mini Kit (Qiagen). EtOH: etanol al 70 % (65)

### -Cuantificación del RNA

Para la cuantificación del RNA se utilizó el kit comercial *Quant-iT RNA Assay*. Este kit consta del reactivo (Quant-iT RNA reagent) y un tampón (Quant-iT RNA buffer) que en una dilución 1:200 constituye la solución de trabajo. Además, incluye dos soluciones estándares (Quant-iT Standard 1 y 2). Se preparó un tubo con 190 µl de solución de trabajo y 10µl de Quant-iT Standard 1. De la misma forma se preparó otro tubo con el Quant-iT Standard 2. Por otro lado se preparó un tubo para cada muestra con 199µl de solución de trabajo y 1µl de muestra. Se dejaron incubar durante 10 minutos. Posteriormente, se midió la fluorescencia en el Qubit-fluorómetro; dicha fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de RNA.

Previamente a la cuantificación de las muestras problema, se midió la cantidad concentración de ARN en las muestras estándares para calibrar el aparato.

El ARN cuantificado se trató con una *DNasa I Amp Grade*, purificada de páncreas bovino con una actividad de  $\geq 10,000$  U/mg (1 U/ $\mu$ l, Invitrogen), siguiendo un protocolo ya descrito anteriormente por el grupo de investigación de superficie ocular del IOBA (65). Este tratamiento se realizó para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico de las muestras.

#### **-Síntesis del ADN complementario (ADNc)**

Durante esta etapa, el ADNc es retrotranscrito a partir del ARN muestra utilizando como cebadores hexámeros aleatorios (*random hexamer*).

Para ello, se mezclaron 1  $\mu$ l de “*random hexamer*” (50ng/ml), 2  $\mu$ g del ARN correspondiente y el agua necesaria para obtener un volumen final de 33  $\mu$ l. La mezcla se calentó durante 10 minutos a 75°C en un termociclador (Mastercycler® personal, Eppendorf Iberica, S.L.U., Madrid, Spain) para que el ARN se linearizase. Después se añadieron estos 33  $\mu$ l al tubo del kit de síntesis de ADNc M-MuLV Reverse Transcriptase (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH), que contiene el enzima de retrotranscripción M-MuLV,  $Mg^{2+}$  y dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato). Esta nueva mezcla se calentó en el termociclador (Mastercycler® personal, Eppendorf) a 25°C durante 10 minutos y a 37° C durante 60 minutos. (Figura 21) Cuando el ADNc no iba a ser amplificado inmediatamente después, se guardaba a -20°C.

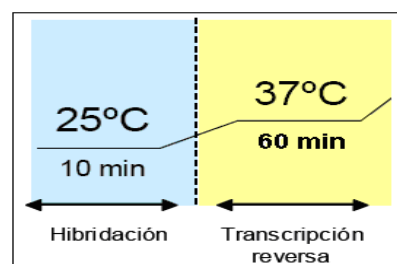


Figura 21. Etapas de la transcripción inversa. (65)

#### **-Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (PCR-TR)**

Para calcular la cantidad de RNA específico de un determinado gen, el DNA complementario que se ha sintetizado en la etapa anterior, se va a someter a una amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Se trata de un ensayo nucleasa 5' fluorogénico que se basa en la utilización de sondas *TaqMan*. (Tabla 5) Estas sondas se unen a una secuencia diana que se encuentra entre los cebadores que permitirán la amplificación de nuestro gen de interés; de esta forma, las amplificaciones inespecíficas no serán detectadas. Las sondas *TaqMan* llevan acoplado en el extremo 5' un *reporter* (fluoróforo, en nuestro caso particular es VIC, que se excita a 528nm y emite a 546nm) y en el extremo 3' un *quencher*, molécula que acepta la energía de un fluoróforo y la disipan en forma de calor o fluorescencia. Nosotros utilizamos un *quencher* denominado TAMRA (se excita a 555nm y emite a 580nm), que disipa la energía por un mecanismo de

*Quenching colisional*, es decir, cuando el fluoróforo está en contacto o muy próximo al *quencher* se produce la transferencia de energía a este, que la disipa en forma de calor.

De esta manera, cuando la Taq DNA polimerasa empieza a amplificar a partir del primer unido al DNA, desplaza el extremo 5' de la sonda que es degradado por la actividad exonucleasa 5' → 3'. Este proceso libera el fluoróforo al medio, separándolo del *quencher*, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia. Figura 22

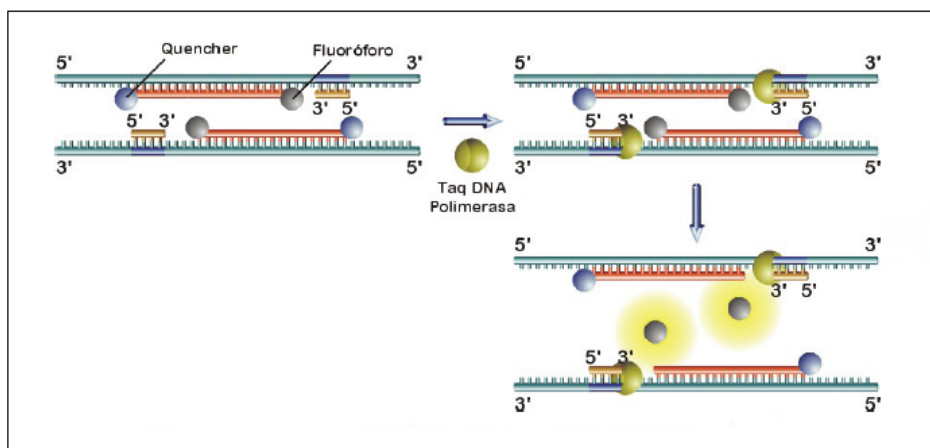


Figura 22. Mecanismo de acción de las sondas *TaqMan* (65)

Se realizó el estudio de la PCR a tiempo real (PCR-TR), utilizando el tampón de reacción “*TaqMan Universal PCR Master Mix*” (Applied Biosystems); este preparado comercial contiene AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, que es una DNA polimerasa termoestable. Esta enzima tiene actividad 5' → 3' exonucleasa, pero ha perdido la actividad 3' → 5' exonucleasa. Además contiene dNTPs con dUTPs (2'-Desoxiuridina-5'-triosfato), AmpErase UNG (enzima que se añade al tampón de reacción para degradar productos generados por amplificaciones anteriores y evitar así falsos positivos).

Los tampones de PCR suelen sustituir el dTTP (2'-Desoxitimidina-5'-trifosfato) por un nucleótido no estándar dUTP. La enzima AmpErase actúa de forma selectiva degradando los productos que contienen este nucleótido para optimizar las condiciones de reacción.

Las amplificaciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Se colocó en cada pocillo de la placa 18 µl de la solución preparada a partir de: H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 20X Target Primers-Sonda y 2X Taqman Universal PCR Master Mix en una proporción 7:1:10 respectivamente. Las sondas TaqMan (que contienen los oligonucleótidos y la sonda complementarios al gen que se pueden amplificar junto al componente fluorescente) utilizadas fueron las siguientes. Tabla 5

Tabla 5. Sondas TaqMan utilizadas en la PCR a tiempo real. GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. VIC, fluoróforo que se excita a 528 y emite a 546 nm. FAM, fluoróforo que se excita a 492 y emite a 515 nm. (65)

Nombre del gen	Nº de Applied Biosystem
GAPDH (VIC)	4326317E
RA alfa <sub>2A</sub> (FAM)	Hs00265081_s1
RA alfa <sub>2B</sub> (FAM)	Hs00265090_s1
RA alfa <sub>2C</sub> (FAM)	Hs01896125_s1

Posteriormente se añadió en cada pocillo 2µl de ADNc de muestra. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El gen GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) se utilizó como control endógeno de cada reacción. En todas las placas se incluyeron dos pocillos como control negativo en los que se colocaron todos los componentes del Kit pero no se añadió muestra de ADNc. Las amplificaciones se realizaron en en termociclador "7500 System SDS Software, Applied Biosystems" con las siguientes temperaturas durante los tiempos determinados.

Figura 23

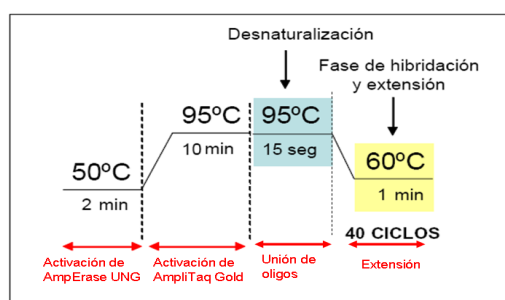


Figura 23. Etapas de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (65)

El análisis de los resultados se realizó siguiendo el método comparativo de ciclos umbrales (65) (Método comparativo  $C_t$ , del inglés *cycle threshold*), que calcula la expresión de los genes normalizados con una referencia endógena y relativa a un calibrador mediante la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Donde  $\Delta C_t$  se calcula mediante:

$$\Delta C_t = C_t \text{ gen de interés} - C_t \text{ gen de referencia}$$

Y el  $\Delta\Delta C_t$  se calcula mediante:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ muestra} - \Delta C_t \text{ calibrador}$$

Los ciclos umbrales de detección de cada muestra se obtuvieron con el software "7500 System SDS



Software, Applied Biosystems". Una vez finalizada la reacción de PCR es necesario establecer el umbral de detección ( $C_t$ , es decir, el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativa con respecto a la señal base, que además es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de ADNc) dentro de la fase exponencial de todas las curvas de amplificación.

### **3.B.2.C. Citocinas y quimiocinas**

#### **-Toma de la muestra**

Previamente a la instilación de colirios se recogió lágrima en dos microcapilares (Microcaps, Drummond Scientific Co. Broomall, Pennsylvania, EEUU) de 4 $\mu$ l cada uno para la determinación de citocinas y quimiocinas. Los capilares se colocaron sobre el menisco lagrimal, intentando evitar la estimulación mecánica. La lagrima así obtenida se guardó en criotubos específicos (marca Sarstedt, referencia 72730105) a -80°C hasta su posterior análisis. (66,67)

#### **-Análisis de la muestra**

Los niveles de citocinas y quimiocinas en las muestras de lágrima se determinaron usando la tecnología de xMAP® (*Multi Analyte Profiling*) de Luminex, en un Luminex IS-100, (Luminex, Luminex Corporation, Holanda).

Se midieron las concentraciones de citocinas/quimiocinas mediante un ensayo comercial *Milliplex HCYTO60K* (Millipore Iberica, Madrid, Spain). Las muestras se midieron siguiendo el protocolo del fabricante; para ello se incubaron con microesferas recubiertas de anticuerpos específicos para cada citocina/quimiocina durante 18 horas a 4°C y con agitación. Después de un lavado, se incubaron las microesferas con anticuerpos anti-citocinas humanas biotinilados durante 1 hora, seguido por la incubación con estreptavidina-ficoeritrina durante 30 minutos y seguidamente las muestras se analizaron en el *Luminex IS-100*. Se utilizaron curvas estándar, obtenidas a partir de muestras de concentración conocida de citocinas humanas recombinantes, para convertir las unidades de fluorescencia en concentración (pg/ml). Los datos se almacenaron y analizaron usando el "*Bead View Software*" (Upstate, Millipore Iberica, Madrid, Spain).

### **3.B.2.D. Análisis de las células de la superficie ocular mediante citometría de flujo**

La obtención mínimamente invasiva de células de la superficie ocular fue llevada a cabo mediante citología por cepillado en la conjuntiva del fondo de saco inferior, abarcando tanto conjuntiva bulbar como tarsal, de los donantes seleccionados.

### **-Toma de la muestra mediante cepillado o brush conjuntival**

Previa colocación de dos gotas de tetracaína (Colircusí Anestésico®) en el fondo de saco conjuntival del ojo a estudio, se procedió a la rotación suave del cepillo (Cytobrush® plus GT, Medscand Medical, Sweden) sobre la conjuntiva tarso-bulbar inferior del ojo a estudio. Figura 24

A continuación, se desprendieron las células por rotación circular del cepillo en 1,4 ml de medio de transporte y/o cultivo (DMEM/F12 suplementado con 1 µg/ml de insulina pancreática bovina, 2 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), 0,1 µg/ml de toxina colérica, 5 µg/ml de hidrocortisona, suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50µg/ml de estreptomina y 2,5 µg/ml de anfotericina B). El procedimiento de cepillado se repitió en 3 ocasiones más, siempre realizándolo en la misma región conjuntival y depositando las células sobre el mismo medio. Posteriormente, se introdujo el tubo con las células en hielo a 4°C y se transportó al laboratorio para su posterior análisis. (5, 68-70)

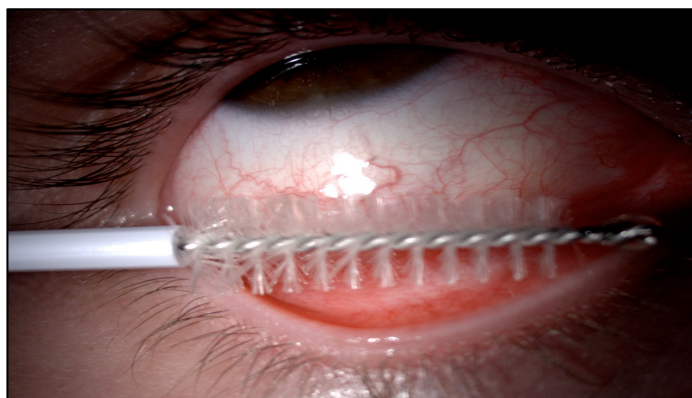


Figura 24. Citología por cepillado (*Brush cytology*) (5) (Elaboración propia)

### **-Caracterización de la población celular obtenida mediante Citometría de Flujo**

Para llevar a cabo dicha caracterización, se realizaron 3 tipos de análisis: linaje celular, viabilidad/apoptosis y ciclo celular. (5)

### **-Anticuerpos y marcadores usados en la citometría de flujo**

Las células recuperadas de la superficie ocular mediante *brush* conjuntival fueron incubadas con diferentes anticuerpos y/o marcadores (Tabla 6) y analizadas utilizando el citómetro de flujo FC 500 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA), que consta de 2 láseres (Argón, excita a 488 nm y HeNe excita a 633 nm) y 5 fotomultiplicadores: FL1 (525 nm), FL2 (575 nm), FL3 (620 nm), FL4 (675 nm) y FL5 (755 nm). Tabla 6

Tabla 6. Marcadores fluorescentes utilizados en la citometría de flujo (5) (Elaboración propia)

Tubo	Anticuerpo/marcador	Clon	Especificidad	Compañía
1	CD3-PC5	UCHT1	Linfocitos T	BC*
	CD4-RD1	SFCI12T4D11	Linfocitos T cooperadores (T <sub>h</sub> )	BC
	CD8-ECD	SFCI21Thy2D3	Linfocitos T citotóxicos (T <sub>c</sub> )	BC
	CD45-FITC	B3821F4A	Leucocitos	BC
2	CD3-FITC	33-2A3	Linfocitos T	IS**
	CD16-PE	B73.1	Linfocitos NK	CL***
	CD19-PC5	J4.119	Linfocitos B	BC
	CD45-PC7	J33	Leucocitos	BC
	CD56-PE	NCAM 16.2	Linfocitos NK	CL
3	Anexina V-FITC		Viabilidad/apoptosis	IS
	Ioduro de propidio		Viabilidad/apoptosis	BC
4	Ioduro de propidio		Ciclo celular	BC

	Tubo 1
	Tubo 2
	Tubo 3
	Tubo 4

PC5: Ficoeritrina-Cianina 5; RD1: Ficoeritrina; ECD: Ficoeritrina-Texas Red®-X

FITC: Isocianato de Fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PC7: Ficoeritrina-Cianina 7

\*BC: Beckman Coulter (Marseille, France)

\*\*IS: Immunostep (Salamanca, Spain)

\*\*\*CL: Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA)

### - Cuantificación del linaje celular-estudio fenotípico

Para determinar el linaje de las células leucocitarias recuperadas en el cepillado o inmunofenotipo, se utilizaron 600 µl de la suspensión celular divididos en 2 alícuotas (tubo 1: 300 µl y tubo 2: 300 µl). En primer lugar, las células se lavaron con 2 ml de una solución de lavado (CellWASH Solution, BD biosciencias, San Jose, USA) para eliminar cualquier resto del medio de cultivo. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 500 g, se decantó el sobrenadante y las células fueron incubadas en oscuridad con los anticuerpos correspondientes (Tabla 6) durante 15 minutos a temperatura ambiente (4 µl de la mezcla de anticuerpos [anti-CD3, CD4, CD8, CD45] para el tubo 1 y 2,5 µl de cada anticuerpo [anti-CD3, CD16+56, CD19, CD45] para el tubo 2). La combinación de anticuerpos nos permitió cuantificar la proporción de linfocitos T, B y NK en el cepillado, y dentro de los T, los subtipos cooperadores (Th) y citotóxicos (Tc). Posteriormente, las células fueron fijadas (15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad) con 500 µl de una solución

de lisis-fijación (FACS™ Lysing solution, BD biosciences, San Jose, USA) y analizadas con el citómetro de flujo. (5)

#### **- Cuantificación de la viabilidad celular-estudio de apoptosis**

Para llevar a cabo el estudio de apoptosis/viabilidad celular se utilizaron otros 300µl de la suspensión celular (tubo 3). En primer lugar, las células se lavaron con 2 ml de una solución de lavado (CellWASH Solution). A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 500 g, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron con 100 µl de una solución tampón (Annexin V Binding Buffer, Immunostep, Salamanca, Spain). Posteriormente, las células se incubaron en oscuridad con 2,5 µl de anexina V-FITC (25 µg/ml) y 5µl de Ioduro de Propidio (a 250 µg/ml) durante 10 minutos a 4°C (Tabla 6). Finalmente, se añadieron 400 µl de la solución de lavado (CellWAH Solution) a la muestra celular quedando lista para su estudio en el citómetro de flujo. (5)

#### **- Cuantificación del ciclo celular-estudio del contenido de ADN**

Para llevar a cabo este análisis se utilizaron otros 300µl de la suspensión celular (tubo 4). Como en anteriores ensayos, las células fueron lavadas en primer lugar con 2ml de una solución de lavado (CellWASH Solution). Posteriormente, y después de centrifugar la muestra a 500 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células fueron permeabilizadas con 50 µl de una solución detergente (DNA-prep LPR, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA). A continuación, se añadió 1ml de una solución con Ioduro de propidio (DNA-prep Stain, Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA), se agitó suavemente y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 37°C, quedando listas las células para ser analizadas en el citómetro de flujo.(5)

De cada uno de los 4 tubos que se prepararon para el citómetro se adquirieron al menos 5.000 eventos para su posterior análisis; los datos se analizaron y representaron gráficamente con el software Cytomics RXP software program (Beckman-Coulter). Todos los días se realizó una comprobación de la calibración del citómetro, de la compensación; y se pasaron tubos de control negativo de los diferentes marcajes realizados (controles de isotipo, suspensiones de células vivas y en división, etc...).

Todas las revisiones y toma de muestras fueron realizadas por el mismo oftalmólogo, conociendo éste el tipo de colirio que utilizaba cada paciente. Sin embargo, las muestras fueron

ensayadas y analizadas por técnicos de laboratorio y colaboradores que no conocían el tratamiento, cumpliendo así con el diseño simple ciego del estudio.

### **3.C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en el presente estudio, se utilizó el software SPSS15.0 (*SPSS Inc, Chicago, EE.UU*) y SAS versión 8.01 (*SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EEUU*). Se realizó un primer análisis descriptivo de todas las variables estudiadas: Cualitativas (porcentajes) y Cuantitativas (medias, mediana, errores estándar de las medias (EEM) y desviaciones estándar (DE) de las medias, máximos, mínimos de cada variable).

La variabilidad en las diferentes características clínicas y de laboratorio estudiadas a lo largo del tiempo se estudiaron y compararon utilizando modelos de análisis de la varianza multivariante. En este contexto, para cada fármaco por separado se compara la visita 0 con el resto, dos a dos, es decir Visita  $i$  vs Visita 0, con  $i=3, 6, 9$  y  $12$ . Cuando las variables son cualitativas ordinales se utiliza el % de cambio, el % de incremento y el % de decremento, definido como el porcentaje de casos que cambian de valor en la visita  $i$  respecto de la visita 0, el número de casos que aumentan su valor en la visita  $i$  y el número de casos que disminuyen su valor, respectivamente. Se construyen intervalos de confianza para cada uno de estos porcentajes. Cuando las variables son cuantitativas se contrasta la igualdad de medias utilizando el contraste paramétrico t-Student para dos muestras pareadas en el caso de que se verifique la hipótesis de normalidad para la diferencia, y el contraste no paramétrico de Wilcoxon con signos, cuando esta hipótesis no puede asumirse.

En cada una de las visitas se evalúa la diferencia entre los dos tratamientos. Cuando las variables son cualitativas se utiliza el análisis de tablas de contingencia, contrastando la hipótesis de independencia con el test chi-cuadrado, o su equivalente exacto, el test de Fisher, cuando no se puede garantizar la convergencia. Cuando las variables son cuantitativas se contrasta la igualdad de medias entre tratamientos utilizando el contraste paramétrico de la t-Student para dos muestras independientes, en el caso de que pueda asumirse normalidad en cada uno de los grupos, y en caso contrario su equivalente no paramétrico, el test U de Mann-Whitney. La misma metodología se utiliza para comprobar las diferencias entre sexos, ojos y edad, agrupada en  $<70$  años y  $\geq 70$  años, en la visita 0.

Se consideraron estadísticamente significativos valores de  $p$  inferiores a 0.05.



## 4. RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.A. GRUPOS MUESTRALES

Se estudiaron un total de 30 pacientes, distribuidos en dos grupos; el grupo I estaba compuesto por pacientes tratados con Alphagan®: 13 pacientes estaban tratados en ambos ojos con Alphagan® y 2 pacientes estaban tratados en un ojo con Alphagan® y en el otro con Combigan® (mixto); y el grupo II estaba formado por pacientes tratados con Combigan®: 15 pacientes estaban tratados en ambos ojos con Combigan® y dos pacientes estaban tratados en un ojo con Alphagan® y en el otro con Combigan® (mixto). Por tanto, se analizaron en total 54 ojos que cumplían los criterios de inclusión y exclusión del estudio.

El periodo de reclutamiento hasta la obtención del número de sujetos se prolongó 3 meses, por lo que la duración de la recogida de muestras del estudio se extendió a 15 meses.

En la Tabla 7 y Figura 25 se muestra el número de pacientes que inició el estudio y los diferentes abandonos y bajas que se fueron produciendo a lo largo del estudio, con el número final definitivo de pacientes que realizó cada tratamiento.

Tabla 7. Características y evolución de los abandonos del estudio

		Grupo I (Alphagan®)	Grupo II (Combigan®)	Total
Número de pacientes		15 (2 mixtos)	17 (2 mixtos)	30
Número de ojos		25	29	54
Intolerancia/ Reacción alérgica	Visita 3	5	2	7
	Visita 6		2	2
	Visita 9			
	Visita 12			
Abandono por decisión propia	Visita 3		4	4
	Visita 6			
	Visita 9			
	Visita 12			
Total Pérdidas	Visita 3	5	6	11
	Visita 6		2	2
	Visita 9			
	Visita 12			
Número final ojos analizados	20	21	41	

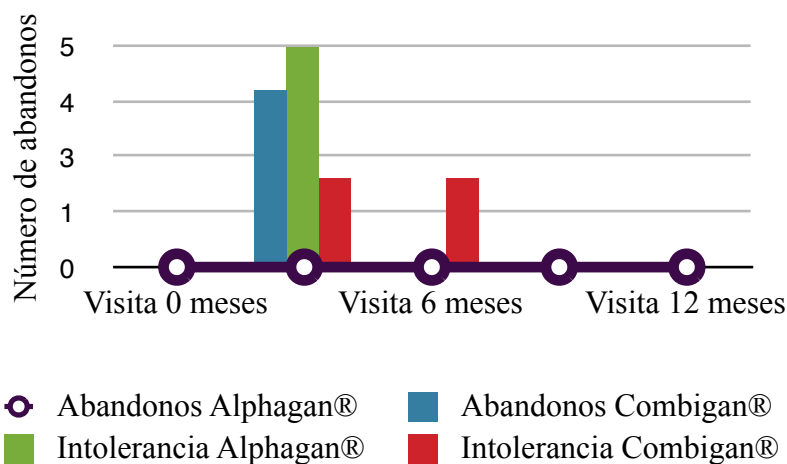


Figura 25. Características y evolución de los abandonos del estudio

#### **4.B. RESULTADOS DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS**

A continuación, se irán exponiendo los resultados obtenidos para cada una de las variables en estudio, y se ilustrarán con las gráficas y las tablas que mejor permiten evaluar la variación de estas variables durante el seguimiento temporal de los pacientes.

Mediante columnas se representarán las medias de los valores de las distintas variables en los diferentes grupos, con sus respectivas desviaciones estándar (DT) en cada una de las visitas. También aparecerán incorporados en las tablas, distintos signos que nos indicarán si existen diferencias estadísticamente significativas en las diferencias de cada uno de los grupos respecto a la visita inicial, y entre los dos grupos en cada visita. Los valores de la significación (p) en cada caso se especifican en cada tabla. Los símbolos utilizados son los mismos en todas las gráficas/tablas, y el color asignado a cada grupo, es el rosa en el grupo I, Alphagan®, y el azul en el grupo II, Combigan®.

En el eje de ordenadas, figura la variable estudiada y se indican las unidades de medida utilizadas. En el eje de abscisas aparecen los tiempos en meses en los cuales se realizó cada visita. Los tiempos reflejados en las gráficas son los de la visita 0 (mes 0), visita 3 (mes 3), visita 6 (mes 6), visita 9 (mes 9) y visita 12 (mes 12).



#### 4.B.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS

Las características demográficas de la población del estudio se reflejan en la tabla 8.

Tabla 8. Características demográficas de los grupos estudiados

	Grupo I (Alphagan®)	Grupo II (Combigan®)	Total
Número de sujetos	25	29	54
Varones	13	16	25 (46,3%)
Hembras	12	13	29 (53,7%)
Ojo a estudio Derecho	13	15	28 (51,9%)
Ojo a estudio Izquierdo	12	14	26 (48,1%)
Edad > 70 años	15	11	26 (48,1%)
Edad < 70 años	12	16	28 (51,9%)

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las características demográficas de ambos grupos ( $p>0.05$ ), pero de forma pormenorizada se detallan las diferencias que se observaron respecto a las variables sexo y edad.

#### SEXO

Respecto al sexo sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas con dos variables; por un lado se observó que la PIO fue mucho mayor en el grupo de hembras. Figura 26

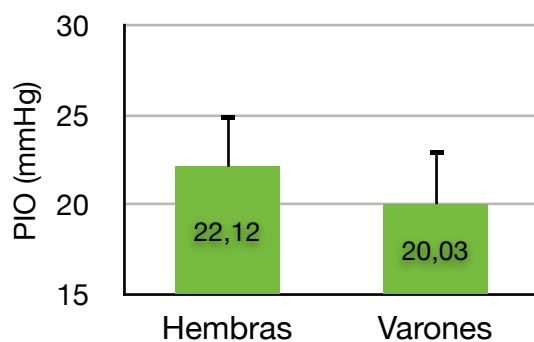


Figura 26. Valores de la PIO (mmHg) en función sexo

Por otro lado, se observó que algunas citocinas variaban en función del sexo, así, la citocina VEGF se encontraba más elevada en el grupo de varones (valores > 20), mientras que en las hembras los valores eran siempre < 10 (p-valor: 0,017); también se observó que el valor de la citocina IL 8 estaba entre 10-20 sólo en el grupo de los hombres (p-valor: 0,033).

## EDAD

La distribución por edad en el grupo a estudio se definió en dos estratos etarios, ya que por la propia fisiopatología del glaucoma, la edad de posible aumento de la PIO se concentra en sujetos mayores o menores de 70 años.

Se observó que la citocina Fractalquina se encontraba significativamente más elevada en el grupo de sujetos mayores de 70 años (p-valor: 0,038). Figura 27

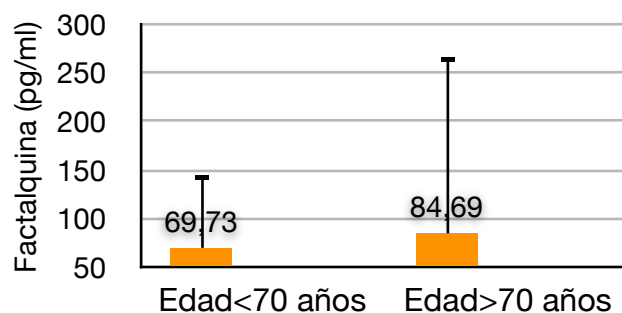


Figura 27. Niveles de Fractalquina (pg/ml) en función de la edad

### 4.B.2. VARIABLES CLÍNICAS

Se observaron cambios estadísticamente significativos en al menos uno de los dos tipos de fármacos y en al menos una de las revisiones, respecto a la visita inicial en los siguientes parámetros clínicos. Tablas 9-14, Figuras 28-33:

-Encuesta Clínica Estandarizada. *Symptoms of Discomfort Questionnaire (Allergan Protocol)*: en los sujetos tratados con Alphagan® se produjo un aumento significativo en la visita 9 respecto a la visita 0.

-Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo (NIBUT): se produjo un descenso significativo respecto a la visita 0 en la visita 12 para los sujetos tratados con ambos fármacos, y en las visitas 6 y 9 para Combigan®.

-Test de Schirmer con anestesia: se produjo un descenso significativo respecto a la visita 0 en las visitas 6, 9 y 12 para Combigan®, y en la visita 12 para Alphagan®; en la visita 3 se produjo un ascenso significativo respecto a la visita 0 en Alphagan®.

-Escala de Oxford: la gradación en dicha escala alcanzó su valor más alto en la visita 3 para ambos fármacos.

-PIO: se produjo un descenso significativo respecto a la visita 0 en todas las visitas para ambos fármacos.

Se observaron cambios estadísticamente significativos entre ambos tipos de fármacos en al menos una de las revisiones, en los siguientes parámetros clínicos. Tablas 9-14, Figuras 27-32:

-Encuesta Clínica Estandarizada. *Symptoms of Discomfort Questionnaire (Allergan Protocol)*: para ambos fármacos se produjo un aumento significativo en la visita 6 respecto a la visita 0.

-Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo (NIBUT): se produjo un aumento significativo en las visitas 0, 3 y 9 para Combigan®.

-Escala de Oxford: se alcanzó la gradación más alta para Alphagan®.

-Escala Van Bijsterveld: se produjo un aumento en la visita 12 para Alphagan®.

-PIO: se produjo un descenso significativo en las visitas 3 y 12 para Alphagan®, y en la visita 12 para Combigan®.

Tabla 9. Resultados de la Encuesta Clínica Estandarizada. *Symptoms of Discomfort Questionnaire (Allergan Protocol)* en los sujetos del estudio

		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12
Alphagan®	Sujetos	25	22	20	20	20
	Media	7,16	5,68	4,85	5,15	6,05
	DT	4,41	4,62	3,44	2,37	4,52
	p-valor			0,18*	0,023 #	
Combigan®	Sujetos	29	23	19	19	21
	Media	5,79	4,04	3,11	3,58	6,48
	DT	5,56	3,6	1,76	1,68	6,48
	p-valor			0,09*		

\* =  $p < 0.05$  (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# =  $p < 0.05$  (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la visita 6, donde el valor de la encuesta era estadísticamente significativo mayor en la visita 0 en ambos fármacos; y en la visita 9 donde era significativamente mayor en el grupo de sujetos tratados con Alphagan®.

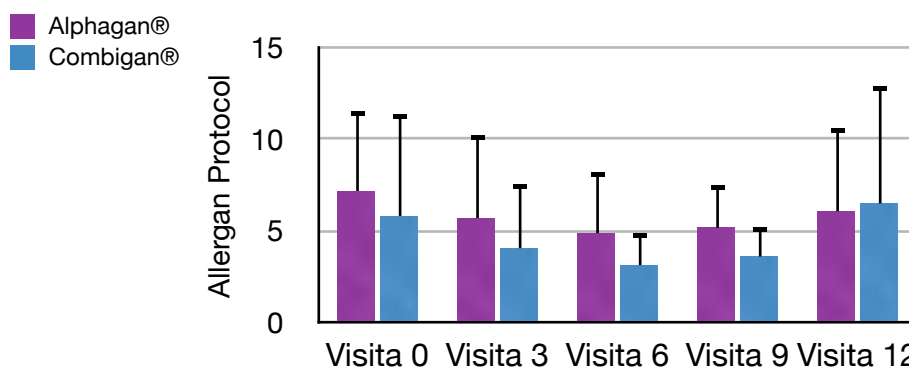


Figura 28. Resultados de la Encuesta Clínica Estandarizada. *Symptoms of Discomfort Questionnaire (Allergan Protocol)* en los sujetos del estudio

Tabla 10. Variaciones del Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo (NIBUT) en los sujetos del estudio

		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12
Alphagan®	Sujetos	21	22	20	20	20
	Media	9,83	9,82	10,45	8,55	8,7
	DT	1,61	1,56	1,54	0,94	0,92
	p-valor					0,038*
Combigan®	Sujetos	22	23	21	21	21
	Media	11,07	11,3	9,67	9,24	6,48
	DT	1,65	1,15	1,88	0,83	0,63
	p-valor	0,07#	0,01#	0,014*	0,002* 0,028#	0,001*

\* =  $p < 0.05$  (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# =  $p < 0.05$  (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las visitas 6, 9 y 12 donde el valor del NIBUT fue mayor en la visita 0 que en las siguientes; en la visita 12 se reduce

significativamente en los dos grupos de pacientes; y en las visitas 6 y 9 sólo en los tratados con Combigan®. También se observan diferencias estadísticas entre ambos fármacos ya que el valor del NIBUT fue significativamente mayor en los tratados con Combigan® en las visitas 0, 3 y 9.

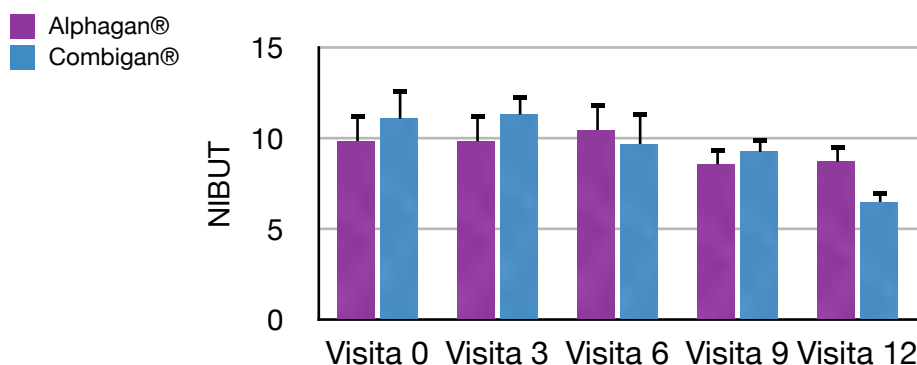


Figura 29. Variaciones del Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo (NIBUT) en los sujetos del estudio

Tabla 11. Valores del Test de Schirmer con anestesia en los sujetos del estudio

		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12
Alphagan®	Sujetos	25	22	20	20	20
	Media	17,2	19,18	17	15,75	13,35
	DT	4,71	6,28	4,7	5,91	6
	p-valor		0,026*			0,015*
Combigan®	Sujetos	29	23	21	21	21
	Media	18,79	20,09	16,05	15,33	15,48
	DT	5,61	6,44	6,48	5,42	4,72
	p-valor			0,045*	0,001*	0,011*

\* =  $p < 0.05$  (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# =  $p < 0.05$  (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para los sujetos tratados con Alphagan® en las visitas 3 y 12; donde el valor del test de Schirmer respecto a la visita 0 desciende en la visita 12, mientras que se eleva en la visita 3; en cambio, en los sujetos tratados con

Combigan® se produce un descenso en el valor del Schirmer con respecto a la visita 0 en las visitas 6, 9 y 12.

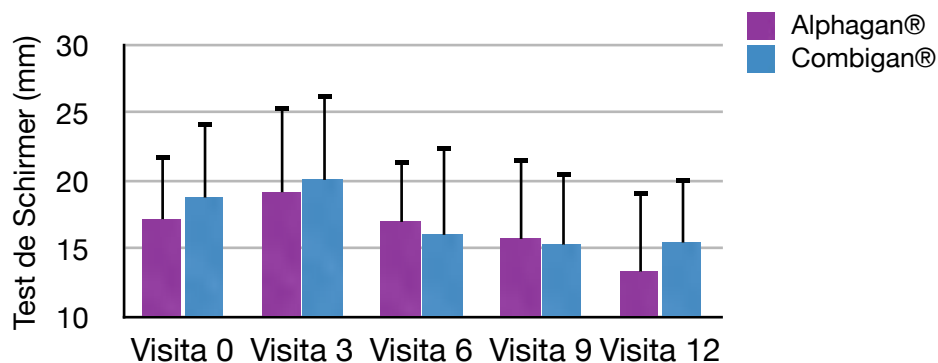


Figura 30. Valores del Test de Schirmer con anestesia en los sujetos del estudio

Tabla 12. Gradación de la Escala de Oxford en los sujetos del estudio

		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12
Alphagan®	Sujetos	25	22	20	20	20
	A	13	10	4	5	7
	B	12	6	14	9	8
	C		4	2	5	5
	D		1		1	
	E		1			
	p-valor		☆41%		0,024#	
Combigan®	Sujetos	29	23	21	21	21
	A	16	8	9	11	11
	B	11	14	11	10	7
	C	2	1	1		3
	D					
	E					
	p-valor		☆48%			

\* =  $p < 0.05$  (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# =  $p < 0.05$  (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

☆ = % casos que toman valores mas altos que en la visita 0

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la visita 3 donde el valor de la Escala de Oxford, para ambos fármacos, fue significativamente mayor que en la visita 0. Además, en la visita 9 se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos fármacos ya que los sujetos tratados con Alphagan® alcanzaron gradaciones más altas en la escala (los tratados con Combigan® solo alcanzan la gradación A y B) y a igualdad de gradación en A y B, el número de sujetos fue menor en los tratados con Alphagan®.

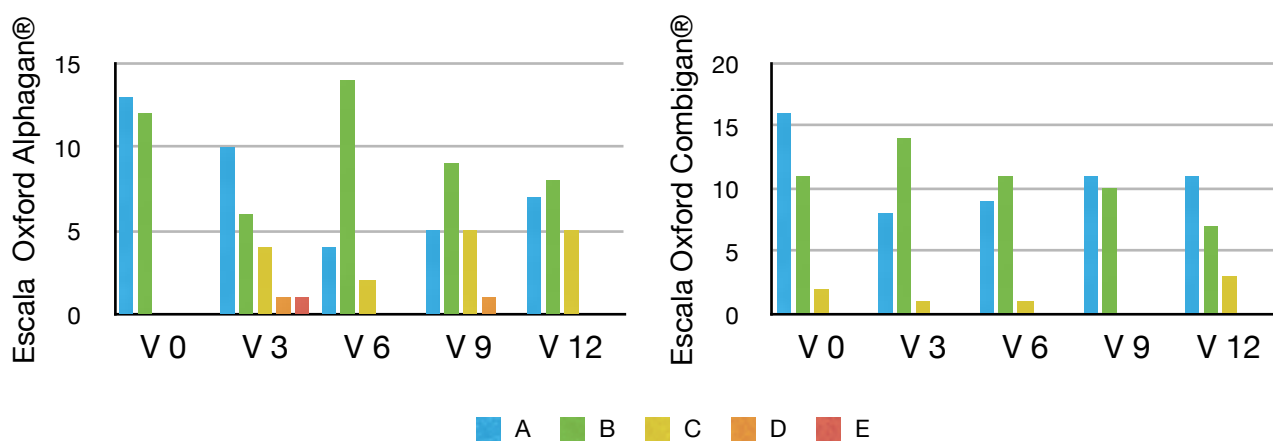


Figura 31. Gradación de la Escala de Oxford en los sujetos del estudio

Tabla 13. Gradación de la Escala de Van Bijstervald en los sujetos del estudio

		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12
Alphagan®	Sujetos	25	22	20	20	20
	Media	1,2	0,86	1,2	2,5	1,3
	DT	0,65	1,04	1,06	2,24	0,73
	p-valor					0,011#
Combigan®	Sujetos	29	23	21	21	21
	Media	1,10	0,78	0,86	0,86	0,62
	DT	1,26	0,8	0,85	1,06	0,86
	p-valor					

\* =  $p < 0.05$  (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# =  $p < 0.05$  (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la visita 12 donde el valor de la Escala de van Bijstervald fue significativamente mayor en los sujetos tratados con Alphagan®.

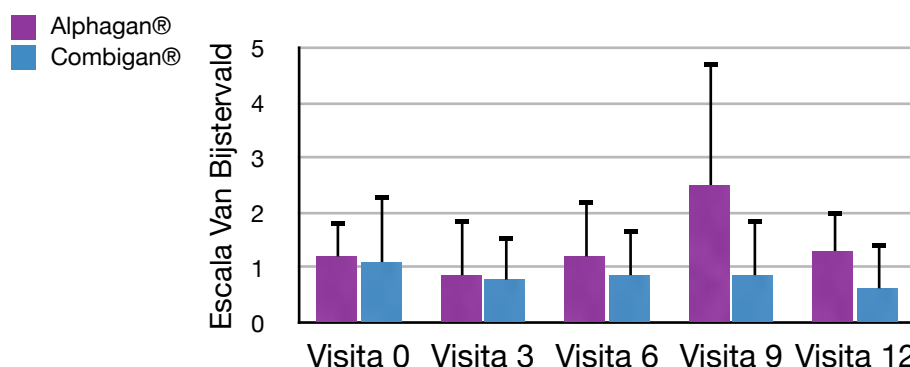


Figura 32. Gradación de la Escala de Van Bijstervald en los sujetos del estudio

Tabla 14. Variaciones de la PIO en los sujetos del estudio

		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12
Alphagan®	Sujetos	25	22	20	20	20
	Media	21,12	17,23	14,35	14,95	15,85
	DT	3,41	3,41	1,53	3,03	1,79
	p-valor		<0,01* 0,05#	<0,01*	<0,01*	<0,01*
Combigan®	Sujetos	29	23	21	21	21
	Media	20,9	14,78	13,52	14,38	17,62
	DT	2,97	1,95	1,47	2,65	2,31
	p-valor		<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01* 0,037#

\* =  $p < 0.05$  (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# =  $p < 0.05$  (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

Se observaron reducciones significativas de la PIO para los pacientes que han utilizado ambos fármacos y además en todas las visitas, ya que la PIO descendió en todas ellas tras iniciar el tratamiento. Al comparar ambos fármacos entre si, se observó que este descenso en la PIO alcanzó



diferencias estadísticamente significativas en la visita 3 para los sujetos tratados con Alphagan®, y en la visita 12 para los tratados con Combigan®.

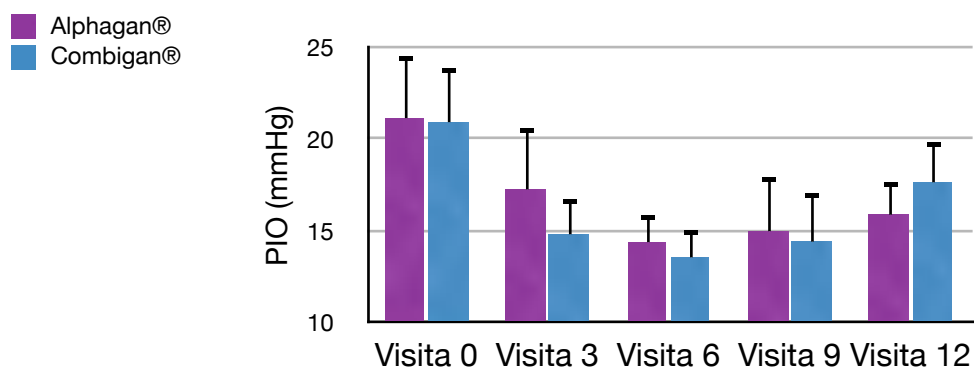


Figura 33. Variaciones de la PIO en los sujetos del estudio

#### 4.B.3. VARIABLES DE LABORATORIO

##### CIC por Impresión conjuntival para microscopía óptica. Estadiaje de Nelson

Aunque en este parámetro no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, desde el punto de vista clínico merece la pena comentar que se pudo observar que en aquellos sujetos tratados con Alphagan®, un 25% presentaban valores más bajos en la gradación de la Escala de Nelson en la visita 12 que en la 0; mientras que los sujetos tratados con Combigan® estos valores eran un 33% más altos en la visita 12 que en la 0.

Tabla 15. Valores de la Escala de Nelson en los sujetos del estudio

		Visita 0	Visita 12
Alphagan®	Sujetos	20	20
	grado 0	3	3
	Grado 1	15	17
	Grado 2	2	0
	Grado 3	0	0
	Snakes	0	0
	p-valor		
	Sujetos	20	19

		Visita 0	Visita 12
Combigan®	Grado 0	6	3
	Grado 1	14	16
	Grado 2	0	0
	Grado 3	0	0
	Snakes	0	0
	p-valor		

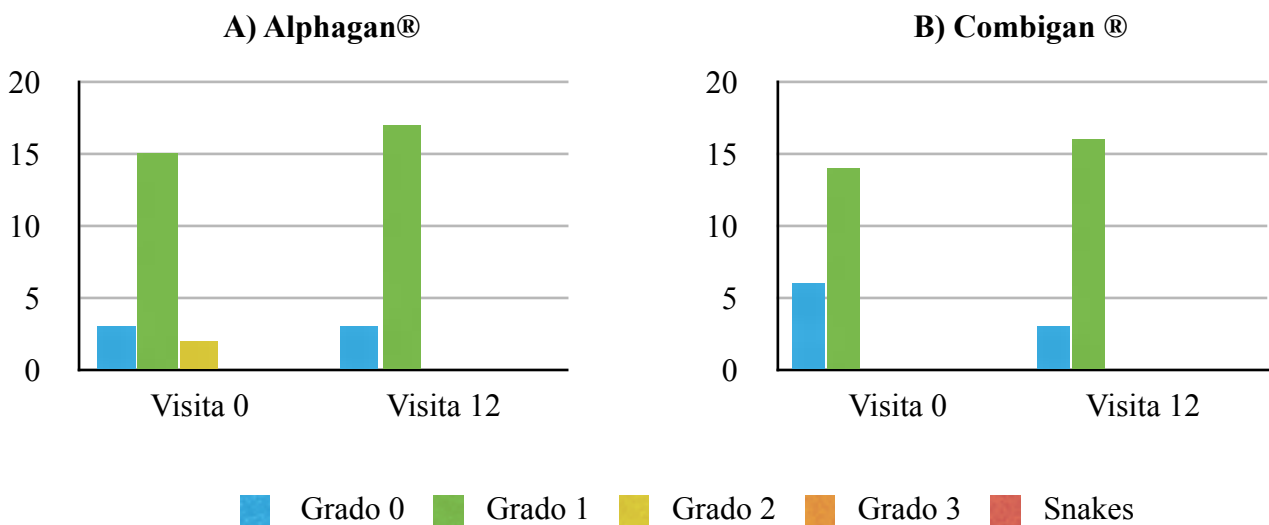


Figura 34. Valores de la Escala de Nelson en los sujetos del estudio. A) Alphagan®; B) Combigan®

### RT-PCR para la cuantificación genes de receptores alfa-2 adrenérgicos

Respecto a la expresión genética de los receptores alfa-2 adrenérgicos, tampoco se encontraron diferencias significativas. Pero merece la pena que comentemos los resultados, pues muestran tendencias que pueden tener relevancia clínica. Se observó que en ambos grupos de tratamiento se producía un aumento de la expresión de los tres receptores en la visita 12 respecto a la visita 0, aunque dicho aumento fue diferente en función de cada receptor; Así, en los pacientes tratados con Combigan® se aprecia una tendencia al aumento de la expresión del receptor alfa-2A, en tanto que el alfa-2B incrementa al tratar con Alphagan®, y el alfa-2C aumenta en los 2 tratamientos. Tabla 16, Figura 35

Tabla 16. Variación en la expresión relativa de ARNm en los sujetos del estudio tras 12 meses de tratamiento

		Expresión relativa ARNm 12 meses		
		Adra2A	Adra2B	Adra2C
Alphagan®	Media	4,33	4,36	1,86
	DT	1,34	1,03	0,35
Combigan®	Media	5,65	2,96	1,86
	DT	1,16	0,95	0,66

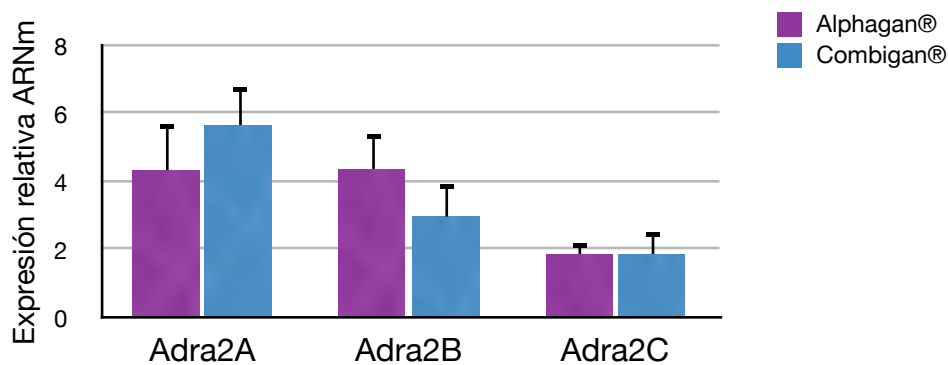


Figura 35. Variación en la expresión relativa de ARNm en los sujetos del estudio tras 12 meses de tratamiento

### Citocinas y Quimiocinas

En el estudio de citocinas y quimiocinas, se apreció un incremento estadísticamente significativo para todas las citocinas en el Grupo de pacientes tratados con Alphagan®, salvo para el interferon  $\gamma$ . En la lágrima de los pacientes tratados con Combigan®, se evidencia un descenso significativo de la eotaxina, y de la IL-1 $\beta$ 1, no encontrándose ningún incremento significativo.

Tabla 17, Figuras 36-44

Tabla 17. Cuantificación de las citocinas y quimiocinas en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses del mismo

Citocinas (pg/ml)		Visita 0	Visita 12	
Alphagan®	Eotaxina	Sujetos	19	20
		Media	19,68	70,99
		DT	24,91	278,37
		p-valor		0,031*
	Factalquina	Sujetos	19	20
		Media	32,95	193,59
		DT	45,81	297,01
		p-valor		<0,01*
	Il-6	Sujetos	19	20
		Media	2,24	13,36
		DT	4,57	21,09
		p-valor		0,012*
	IL-8	Sujetos	19	20
		Media	30,3	283,96
		DT	68,27	558,14
		p-valor		0,003* / 0,03#
	VEGF	Sujetos	19	20
		Media	14,91	52,48
		DT	15,52	38,55
		p-valor		0,001*
IP-10	Sujetos	19	20	
	Media	1560,81	3260,41	
	DT	5707,75	3385,17	
	p-valor		<0,001*	

Citocinas (pg/ml)		Visita 0	Visita 12	
	Rantes	Sujetos	19	20
		Media	1,84	4,48
		DT	1,39	5,35
		p-valor		0,02* / 0,007#
	IL1 $\beta$ 1	Sujetos	19	20
		Media	5,05	36,92
		DT	5,97	159,14
		p-valor		0,033*
	INF $\gamma$	Sujetos	19	20
		Media	1,44	1,76
		DT	0,53	2,39
		p-valor		
	Eotaxina	Sujetos	19	20
		Media	24,79	3,06
		DT	62,81	0,00
		p-valor	0,005*	
	Factalquina	Sujetos	19	20
		Media	122,26	154,35
		DT	187,09	135,30
		p-valor	0,023#	
	IL-6	Sujetos	19	20
		Media	4,45	6,19
		DT	7,42	6,0
		p-valor		
	IL-8	Sujetos	19	20
		Media	49,51	37,77
		DT	85,69	26,0

Citocinas (pg/ml)		Visita 0	Visita 12	
Combigan®		p-valor		
	VEGF	Sujetos	19	20
		Media	70,97	31,20
		DT	121,86	19,85
		p-valor		
	IP-10	Sujetos	19	20
		Media	3654,81	4553,3
		DT	4521,95	3257,46
		p-valor		
	Rantes	Sujetos	19	20
		Media	2,16	1,85
		DT	1,47	1,06
		p-valor		
	Il1β1	Sujetos	19	20
		Media	12,26	1,07
		DT	41,59	0,0
		p-valor	0,027*	
	INFγ	Sujetos	19	20
		Media	1,68	1,2
		DT	0,66	0,0
p-valor		0,004*		

\* = p<0.05 (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# = p<0.05 (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

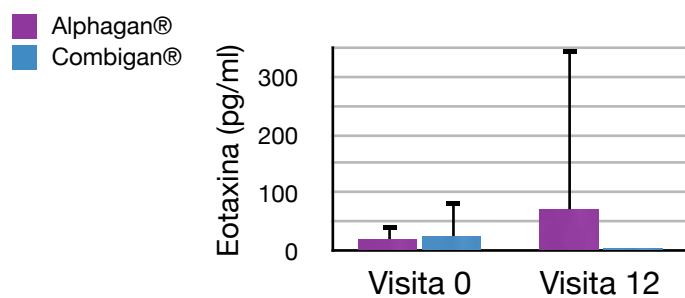


Figura 36. Cuantificación de Eotaxina en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses del mismo

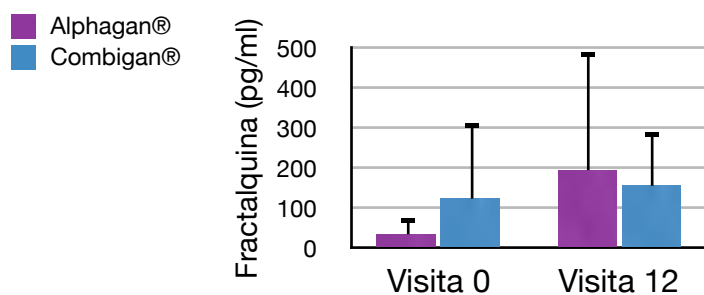


Figura 37. Cuantificación de Fractalquina en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses del mismo

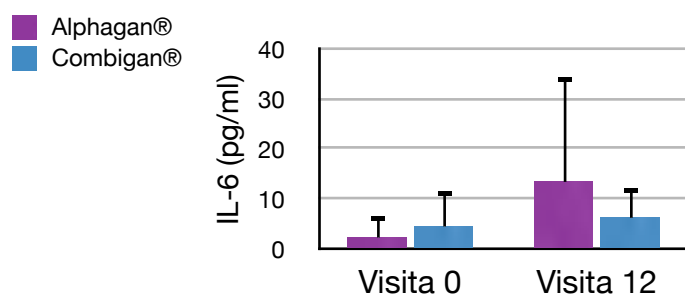


Figura 38. Cuantificación de IL-6 en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses del mismo

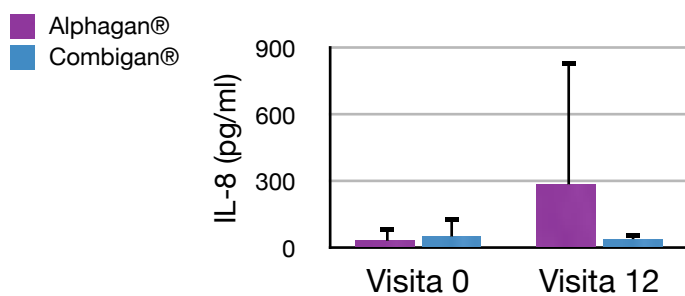


Figura 39. Cuantificación de IL-8 en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses del mismo

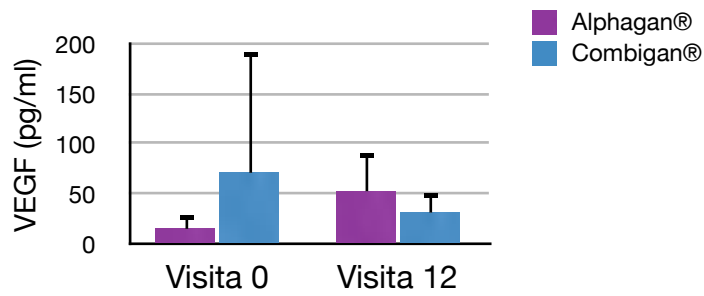


Figura 40. Cuantificación de VEGF en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses del mismo

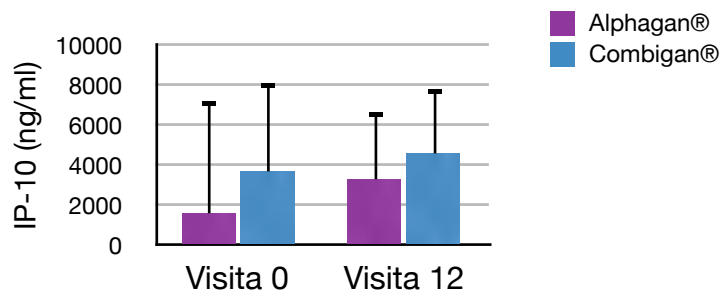


Figura 41. Cuantificación de IP-10 en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses del mismo

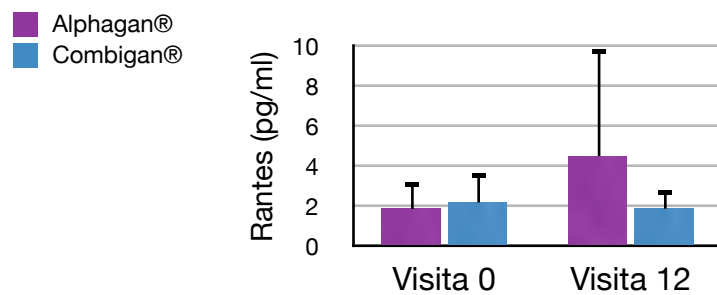


Figura 42. Cuantificación de RANTES en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses de tratamiento

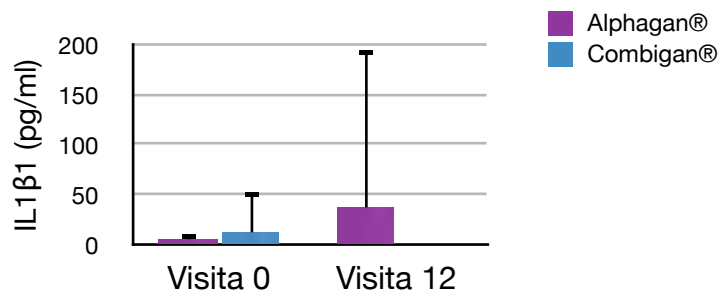


Figura 43. Cuantificación de IL1β1 en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses de tratamiento



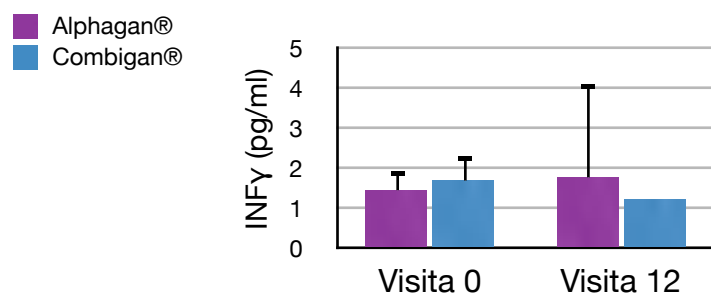


Figura 44. Cuantificación de INF $\gamma$  en los sujetos del estudio, antes de iniciar el tratamiento y tras 12 meses del mismo

### **Análisis mediante citometría de flujo de las células de la Superficie Ocular (epitelio conjuntival) obtenidas mediante *brush conjuntival*.**

#### **Fenotipo de IELs**

Se evidenciaron cambios significativos en al menos uno de los dos grupos de pacientes y en al menos una de las revisiones, respecto a la visita inicial en los siguientes parámetros inmunológicos del fenotipo de IELs. Tabla 18, Figuras 45-54:

- Número Linfocitos Totales: se observó un descenso significativo en la visita 12 para Alphagan®.
- % Linfocitos T Totales: se observó un descenso en la visita 9 para Combigan®.
- % Linfocitos Th: se observó un descenso en la visita 12 para Combigan®.
- % Linfocitos B Totales: se observó un aumento en la visita 9 para Combigan®.
- % Linfocitos NK: se observó un descenso en la visita 9 para Combigan®, y en la visita 12 para Alphagan®.
- Cociente T/B: se observó un descenso en las visitas 9 y 12 para Combigan®.

Se observaron cambios estadísticamente significativos entre los grupos de pacientes tratados con diferentes fármacos en al menos una de las revisiones, en los siguientes parámetros inmunológicos del fenotipo de IELs. Tabla 18, Figuras 45-54:

- Número Linfocitos Totales: se observó un descenso en la visita 9 para Alphagan®.
- % Linfocitos T Totales: se observó un aumento en la visita 9 para Alphagan®.
- % Linfocitos Tc: se observó un aumento en la visita 9 para Alphagan®.
- % Linfocitos B Totales: se observó un aumento en la visita 9 para Combigan®.

-% Linfocitos NK: se observó un aumento en la visita 9 para Alphagan®, y en la visita 12 para Combigan®.

-Cociente T/B: se observó un aumento en la visita 9 para Alphagan®.

-Cociente Th/Tc: se observó un aumento en la visita 9 para Combigan®.

Tabla 18. Variaciones observadas en el Fenotipo de IELs del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

Fenotipo IELs		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12	
Alphagan®	Número Linfocitos Totales	Sujetos	24	22	19	20	20
		Media	527,21	569,77	521,79	323,2	320,55
		DT	474,9	646,94	410,57	322,48	385,13
		p-valor				0,037#	0,044*
	% Linfocitos Totales	Sujetos	24	22	19	20	20
		Media	3,45	2,4	2,85	2,18	2,26
		DT	3,74	1,78	2,26	1,68	1,76
		p-valor					
	% Linfocitos T Totales	Sujetos	20	19	16	19	18
		Media	77,68	79,25	78,33	80,93	80,29
		DT	13,95	14,07	11,43	8,4	5,64
		p-valor				0,05#	
	% Linfocitos Th	Sujetos	20	19	16	18	18
		Media	39,02	32,84	30,32	31,19	35,91
		DT	12,58	13,21	13,62	12,82	12,08
		p-valor					
	% Linfocitos Tc	Sujetos	20	19	16	18	18
		Media	38,96	45,98	48,13	50,17	43,69
		DT	16,38	20,43	23,04	17,87	14,59
		p-valor				0,011#	
	Sujetos	20	19	16	19	18	

Fenotipo IELs		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12	
	% Linfocitos B Totales	Media	21,58	19,52	20,41	16,54	18,98
		DT	13,73	13,41	11,2	8,08	6,47
		p-valor					
	% Linfocitos NK	Sujetos	20	19	16	19	18
		Media	1,77	1,69	1,51	1,95	0,52
		DT	1,47	1,46	1,13	1,12	0,7
		p-valor				0,012#	0,002*
	Cociente Th/Tc	Sujetos	20	19	16	18	18
		Media	1,38	0,96	0,98	0,82	0,99
		DT	1,13	0,75	0,85	0,67	0,55
		p-valor					
	Cociente T/B	Sujetos	20	19	16	19	18
		Media	5,04	6,74	6,18	6,28	4,73
		DT	2,99	5,08	5,79	3,65	1,69
		p-valor				0,034#	
		Número Linfocitos Totales	Sujetos	29	23	21	21
Media			579,41	480,3	456,48	560,10	245,67
DT			524,61	306,23	248,24	513,48	313,19
p-valor							
% Linfocitos Totales		Sujetos	29	23	21	21	21
		Media	3,03	2,47	2,61	3,71	1,6
		DT	1,97	1,39	1,47	2,91	1,2
		p-valor		0,012*			0,002*
% Linfocitos T Totales		Sujetos	24	23	19	19	17
		Media	78,99	82,32	80,05	70,52	76,54
		DT	10,52	8,33	10,03	16,88	9,15

Fenotipo IELs		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12	
Combigan®	p-valor				0,029*		
	% Linfocitos Th	Sujetos	24	23	19	19	17
		Media	35,7	35,77	35,54	35,21	30,05
		DT	11,64	15,53	13,15	10,81	9,99
		p-valor					0,031*
	% Linfocitos Tc	Sujetos	24	23	19	19	17
		Media	43,35	46,41	44,4	35,25	45,31
		DT	13,25	19,12	16,83	16	15,91
		p-valor					
	% Linfocitos B Totales	Sujetos	24	23	19	19	17
		Media	20,08	16,51	18,59	27,96	22,41
		DT	10,59	7,19	9,35	17,84	9,18
		p-valor				0,006* 0,03#	
	% Linfocitos NK	Sujetos	24	23	19	19	17
		Media	1,35	1,59	1,66	1,14	1,35
		DT	0,71	1,02	1,28	1,03	0,94
		p-valor				0,039*	0,05#
	Cociente Th/Tc	Sujetos	24	23	19	19	17
		Media	0,95	0,98	0,96	1,2	0,81
		DT	0,54	0,58	0,53	0,56	0,52
		p-valor				0,031#	
	Cociente T/B	Sujetos	24	23	19	19	17
		Media	5,37	6,01	6,47	4,04	4,44
		DT	3,29	2,85	5,98	2,98	2,9
		p-valor				0,011*	0,039*

\* = p<0.05 (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# = p<0.05 (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

Respecto al linaje celular obtenido mediante citología por cepillado se observó que, para ambos grupos de tratamiento, la mayor parte de las células conjuntivales obtenidas del fornix eran de origen epitelial (CD45 negativas); sin embargo, había una pequeña población de células CD45(+), o leucocitos intraepiteliales, que por su tamaño y complejidad al citómetro eran fundamentalmente linfocitos. Al analizar los distintos subtipos, los linfocitos CD45(+) fueron predominantemente de linaje T y B, aunque también pudo observarse una pequeña población de linfocitos NK.

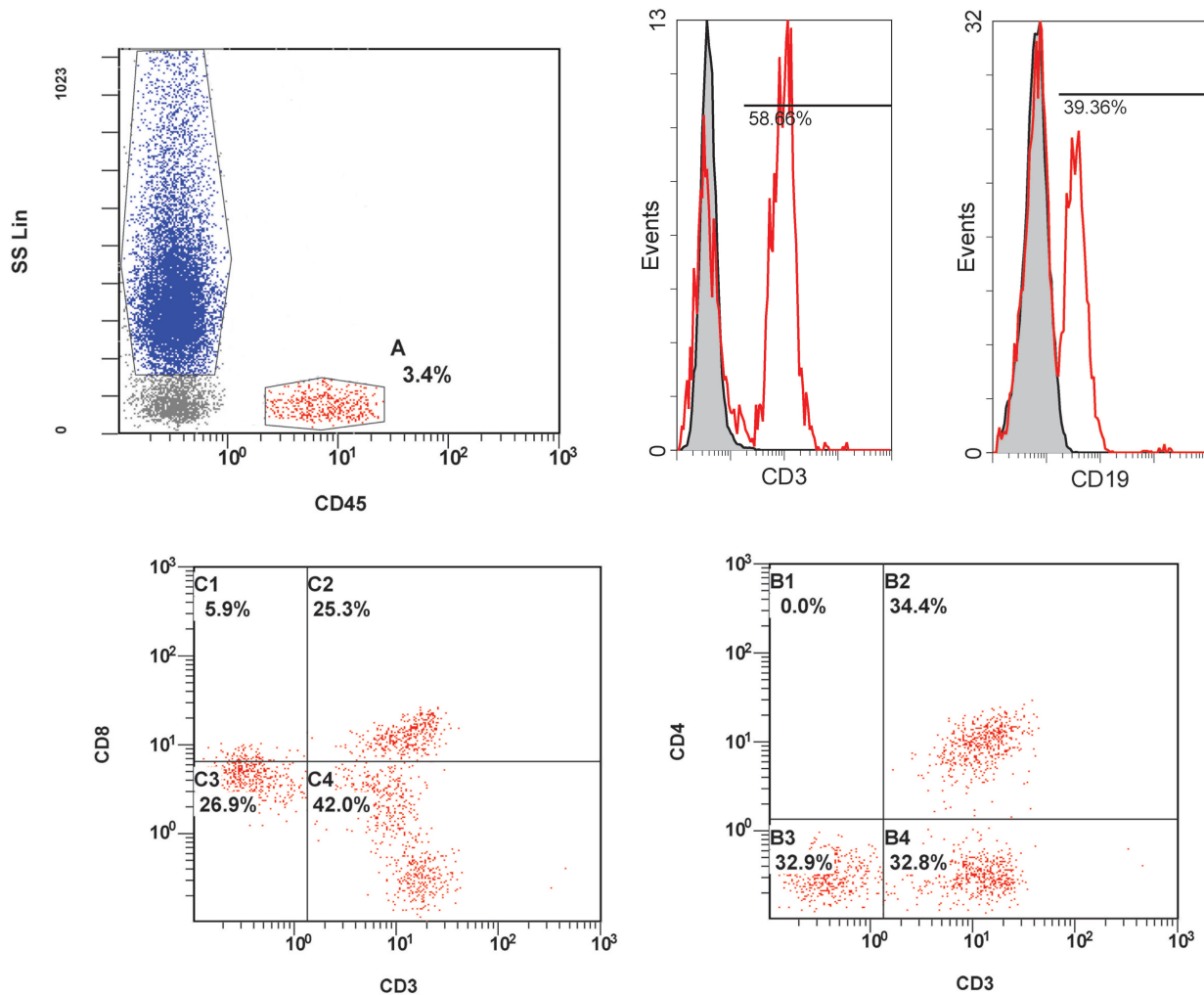


Figura 45. Ejemplo del análisis fenotípico de los IELs mediante citometría de flujo de un individuo del estudio

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos infiltrante totales, que se encontraba más elevado en la visita 12 para los sujetos tratados con Alphagan®, y en las visitas 3 y 9 para los tratados con Combigan®; en el porcentaje de linfocitos T totales, que se encontró más elevado en los sujetos tratados con Combigan® en la visita 9; en el porcentaje de linfocitos B totales, que se encontró más elevado en los sujetos tratados con

Combigan® en la visita 9; y en el porcentaje de linfocitos NK que se encontró más elevado en la visita 12 para los sujetos tratados con Alphagan®, y en la visita 9 para los tratados con Combigan®.

La proporción T/B varió en ambos grupos alcanzando la significación estadística en los sujetos tratados con Combigan® en las visitas 9 y 12 frente al cociente en la visita 0.

En cuanto a la subpoblación de linfocitos T, se observó que el porcentaje de linfocitos T cooperadores o Th se encontraba más elevado en los sujetos tratados con Combigan® en la visita 12.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes tratados con los diferentes fármacos en el número de linfocitos totales infiltrantes, en el porcentaje de linfocitos T totales, en la proporción de linfocitos Tc, porcentaje de linfocitos NK y cociente T/B que se encontraron más elevados en los sujetos tratados con Alphagan® en la visita 9; en el porcentaje de linfocitos B totales y cociente Th/Tc que fue más elevado en los sujetos tratados con Combigan® en la visita 9 y en el porcentaje de linfocitos NK que fue más elevado en la visita 12.

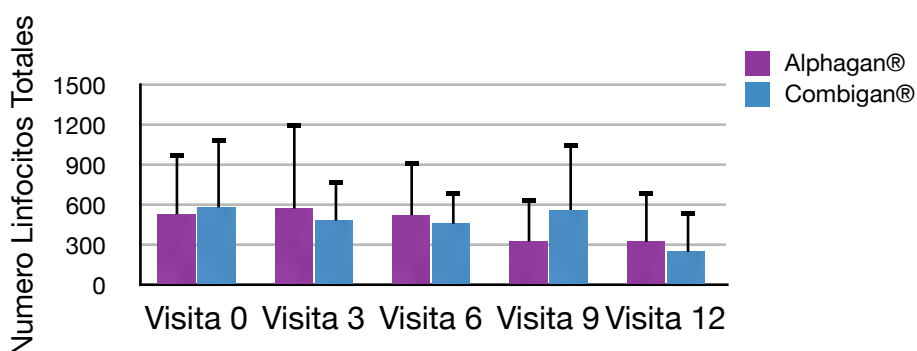


Figura 46. Variaciones observadas en el número de linfocitos totales del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

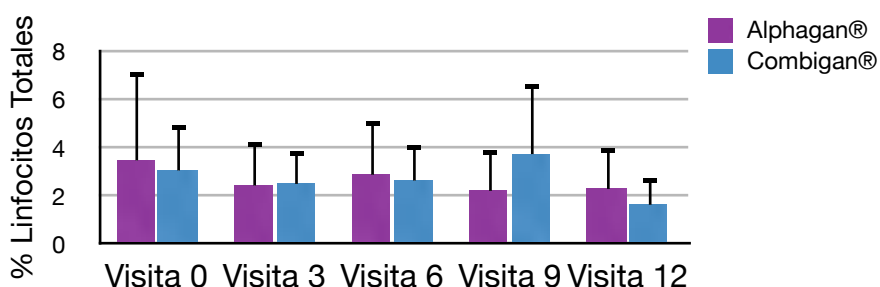


Figura 47. Variaciones observadas en el porcentaje de linfocitos totales del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

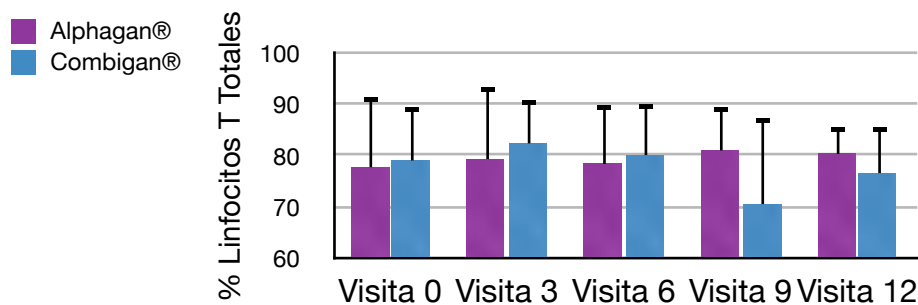


Figura 48. Variaciones observadas en el porcentaje de linfocitos T totales del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

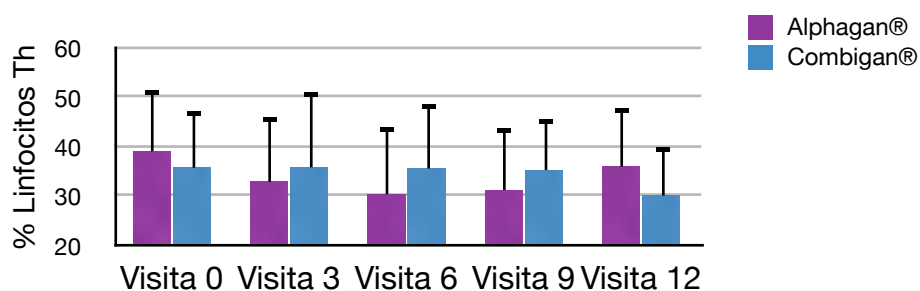


Figura 49. Variaciones observadas en el porcentaje de linfocitos Th del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

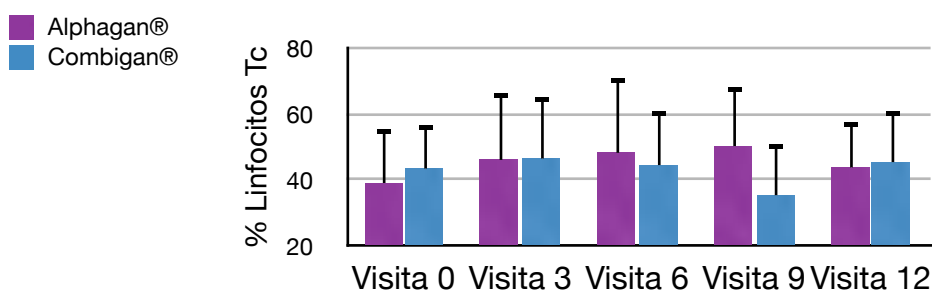


Figura 50. Variaciones observadas en el porcentaje de linfocitos Tc del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

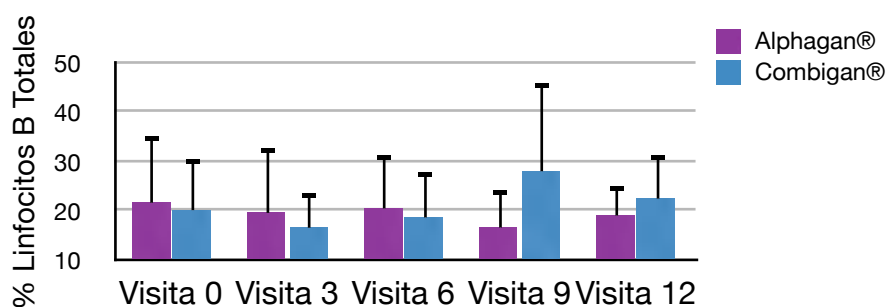


Figura 51. Variaciones observadas en el porcentaje de linfocitos B totales del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

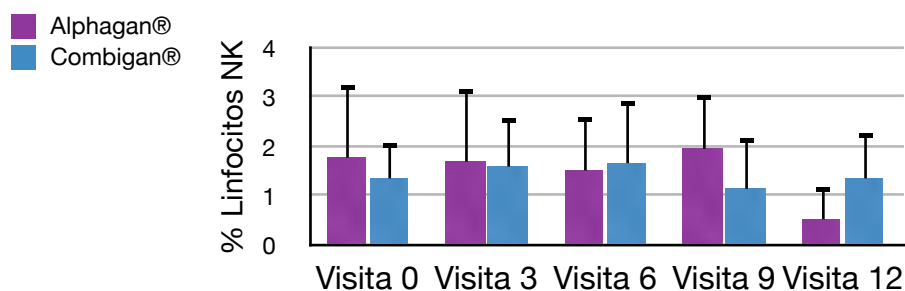


Figura 52. Variaciones observadas en el porcentaje de linfocitos NK del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

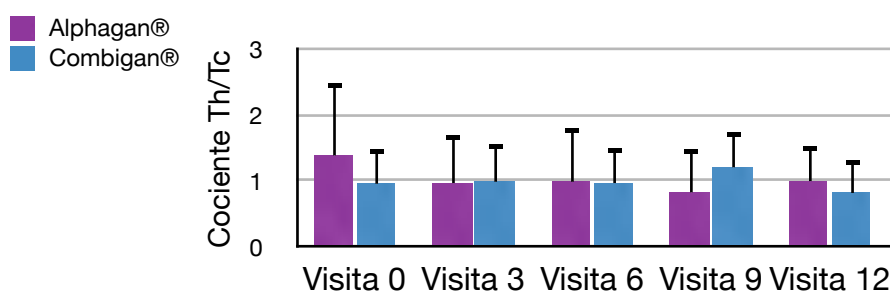


Figura 53. Variaciones observadas en el Cociente Th/Tc del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

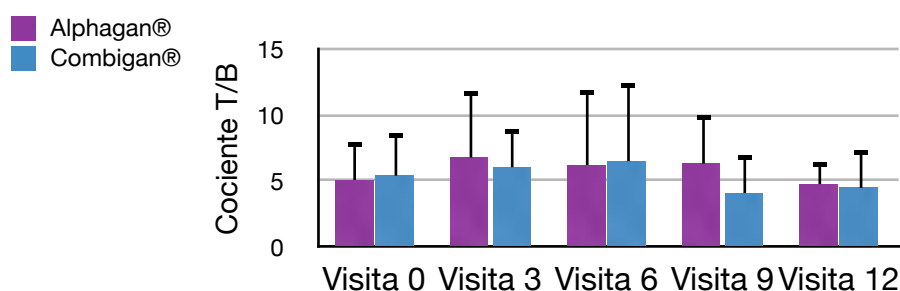


Figura 54. Variaciones observadas en el Cociente T/B del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

### Viabilidad celular

Se observaron cambios estadísticamente significativos en al menos uno de los dos grupos de pacientes y en al menos una de las revisiones, respecto a la visita inicial en los siguientes parámetros de viabilidad celular del epitelio conjuntival. Tabla 19, Figuras 55-64:

-% Células simples: se observó un descenso en las visitas 3 y 12 para Combigan®, y en la visita 9 para Alphagan®.

-% Células complejas: se observó un aumento en las visitas 3, 9 y 12 para Combigan®, y en las visitas 6, 9 y 12 para Alphagan®.



-% Viables células complejas: se observó un descenso en las visitas 9 y 12 para Alphagan®, y en la visita 12 para Combigan®.

-Apoptosis temprana células complejas: se observó un descenso en las visitas 6, 9 y 12 para Combigan®, y en las visitas 9 y 12 para Alphagan®.

-Apoptosis tardía células simples: se observó un descenso en las visitas 6 y 9 para Alphagan®.

- Apoptosis tardía células complejas: se observó un aumento en las visitas 6, 9 y 12 para Combigan®, y en las visitas 9 y 12 para Alphagan®.

-Células muertas simples: se observó un aumento en la visita 12 para Combigan®.

-Células muertas complejas: se observó un aumento en las visitas 3, 6, 9 y 12 para Combigan®, y en las visitas 6, 9 y 12 para Alphagan®.

Se observaron cambios estadísticamente significativos entre los dos grupos de tratamiento en al menos una de las revisiones, en los siguientes parámetros de viabilidad celular conjuntival.

Tabla 19, Figuras 55-64:

-% Células simples: se observó un aumento en la visita 9 para Combigan®.

-% Células complejas: se observó un aumento en la visita 9 para Alphagan®.

-Apoptosis temprana células simples: se observó un descenso en la visita 9 para Combigan®.

-Apoptosis temprana células complejas: se observó para Combigan® que su valor fue más elevado en la visita 0.

-Células muertas complejas: se observó un aumento en la visita 3 para Combigan®.

Tabla 19. Variaciones observadas en la Viabilidad celular del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

Viabilidad		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12	
	% células simples	Sujetos	25	22	18	20	16
		Media	19,06	14,94	15,13	9,53	11,15
		DT	16,25	10,34	8,53	8,33	6,19
		p-valor				0,002*	
	% células complejas	Sujetos	25	22	18	20	16
		Media	72,65	79,19	82,72	88,02	86,27

Viabilidad		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12	
Alphagan®	% células complejas	DT	17,12	12,36	8,4	7,69	7,22
		p-valor			0,025*	0,001* 0,01#	0,009*
	% células viables simples	Sujetos	25	22	20	20	16
		Media	65,8	62,37	65,59	63,2	64,36
		DT	12,56	19,92	17,8	13,37	12,69
		p-valor					
	% células viables complejas	Sujetos	25	22	18	20	16
		Media	18,91	11,7	10,27	11,31	7,34
		DT	16,13	6,16	6,2	9,84	3,38
		p-valor				0,019*	0,006*
	Apoptosis temprana células simples	Sujetos	25	22	18	20	16
		Media	27,75	30,58	30,81	32,16	30,28
		DT	9,88	14,71	16,3	11,66	11,56
		p-valor					
	Apoptosis temprana células complejas	Sujetos	25	22	18	20	16
		Media	41,28	53,15	39,01	29,39	20,81
		DT	17,73	16,13	16,13	11,15	6,94
		p-valor				0,012*	0,001*
	Apoptosis tardía células simples	Sujetos	25	22	18	20	16
		Media	5,29	5,76	2,78	3,16	3,79
DT		3,3	6,44	2,61	2,34	2,01	
p-valor				0,010*	0,025*		
Apoptosis tardía células complejas	Sujetos	25	22	18	20	16	
	Media	36,08	30,92	38,61	45,97	52,94	
	DT	16,22	15,27	8,77	8,86	8,87	
	p-valor				0,026*	0,008*	
	Sujetos	25	22	18	20	16	

Viabilidad		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12	
	Células simples muertas	Media	1,15	1,27	0,81	1,51	1,58
		DT	1,09	1,57	0,55	1,77	1,21
		p-valor					
	Células complejas muertas	Sujetos	25	22	18	20	16
		Media	3,72	4,25	12,09	13,35	18,91
		DT	6,46	4,48	8,81	8,52	8,17
		p-valor			<0,001*	<0,001*	<0,001*
	Combigan®	% células simples	Sujetos	29	23	22	21
Media			21,47	16,79	15,75	18,81	11,68
DT			14,49	11,68	9,26	12,72	8,05
p-valor				0,049*		0,001#	0,007*
% células complejas		Sujetos	29	23	22	21	19
		Media	74,25	77,87	81,13	79,63	84,31
		DT	14,6	13,42	11,83	12,62	10,62
		p-valor		0,012*		0,009*	0,005*
% células viables simples		Sujetos	29	23	22	21	19
		Media	68,92	72,29	69,38	71,7	64,31
		DT	17,71	14,43	14,32	16,76	12,49
		p-valor					
% células viables complejas		Sujetos	29	23	22	21	19
		Media	14,26	14,97	11,94	12,6	6,57
		DT	9,52	10,4	7,97	12,55	5
		p-valor					0,001*
Apoptosis temprana células simples		Sujetos	29	23	22	21	19
		Media	25,72	23,07	26,03	22,85	27,89
		DT	14,19	13,14	13,05	13,26	9,23
		p-valor				0,02#	
		Sujetos	29	23	22	21	19

Viabilidad		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12	
	Apoptosis temprana células complejas	Media	51,48	41,9	30,71	25,58	20,79
		DT	18,14	21,0	13,94	13,66	8,53
		p-valor	0,03#		<0,001*	<0,001*	<0,001*
	Apoptosis tardía células simples	Sujetos	29	23	22	21	19
		Media	4,4	3,83	3,44	4,17	5,92
		DT	4,15	2,41	2,87	3,78	4,29
		p-valor					
	Apoptosis tardía células complejas	Sujetos	29	23	22	21	19
		Media	31,58	33,07	42,98	45,13	57,46
		DT	15,49	14,79	11,29	12,46	12,82
		p-valor			0,025*	0,030*	<0,001*
	Células simples muertas	Sujetos	29	23	22	21	19
		Media	0,94	0,81	1,15	1,28	1,87
		DT	1,27	0,92	1,28	1,35	2,1
		p-valor					0,034*
	Células complejas muertas	Sujetos	29	23	22	21	19
Media		2,74	10,03	14,35	16,7	15,19	
DT		1,51	8,5	7,43	10,14	7,69	
p-valor			0,001* 0,01#	<0,001*	<0,001*	<0,001*	

\* =  $p < 0.05$  (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# =  $p < 0.05$  (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

Al realizar esta técnica (que químicamente es la que menos altera la estructura celular) se pudieron observar dos subtipos celulares claramente diferenciados; por un lado encontramos una población mayoritaria, que estaba compuesta por células más grandes y complejas pero con una baja viabilidad. Por otro lado, encontramos una población minoritaria, y que a diferencia de la anterior, estaba compuesta por células más pequeñas y menos complejas pero con mayor viabilidad.

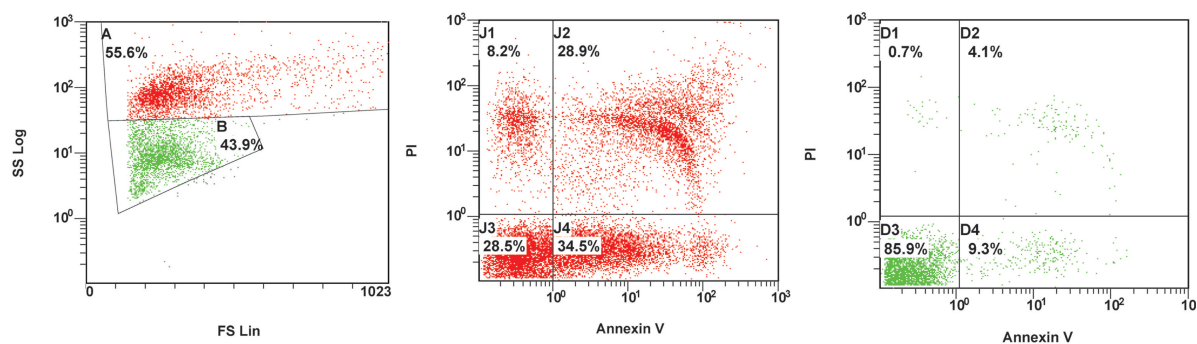


Figura 55. Dot plots presentados a modo de ejemplo del estudio de la viabilidad y apoptosis en un sujeto que ha participado en el estudio. En verde se presentan las células simples y en rojo las células con mayor complejidad.

Respecto a estas dos subpoblaciones, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células simples, que se encontraba disminuido en la visita 9 para los sujetos tratados con Alphagan® y en las visitas 3 y 12 para los tratados con Combigan®; en el porcentaje total de células complejas, que se encontraba más elevado en las visitas 6, 9 y 12 para los tratados con Alphagan® y en las visitas 3, 9 y 12 para los tratados con Combigan®; y en el porcentaje de células viables complejas, que se encontraba disminuido en las visitas 9 y 12 para los tratados con Alphagan® y en la visita 12 para los tratados con Combigan®.

Respecto al porcentaje de células apoptóticas, se alcanzó la significación estadística en las células en apoptosis temprana para células complejas en las visitas 9 y 12 para los tratados con Alphagan®, y en las visitas 6, 9 y 12 para los tratados con Combigan®; y, en cambio, en aquellas células en apoptosis tardía, en las visitas 6 y 9 para las células simples en los tratados con Alphagan®; y en las células complejas en las visitas 9 y 12 para los tratados con Alphagan® y en las visitas 6, 9 y 12 para los tratados con Combigan®.

En lo que se refiere al porcentaje de células muertas, en el grupo de células simples alcanzó la significación estadística en la visita 12 para los sujetos tratados con Alphagan®. Mientras que en el grupo de células complejas lo hizo en las visitas 6, 9 y 12 para los tratados con Alphagan®; y en las visitas 3, 6, 9 y 12 para los tratados con Combigan®.

Al comparar un fármaco con el otro se observó que los sujetos tratados con Alphagan® presentaron un porcentaje más elevado de células complejas en la visita 9; mientras que los tratados con Combigan® presentaron un porcentaje más alto de células simples en la visita 9; la apoptosis temprana de células simples se encontró más elevada en la visita 0, y la de células complejas en la

visita 9; y, por último, el número de células muertas complejas se encontró más elevado en la visita 3.

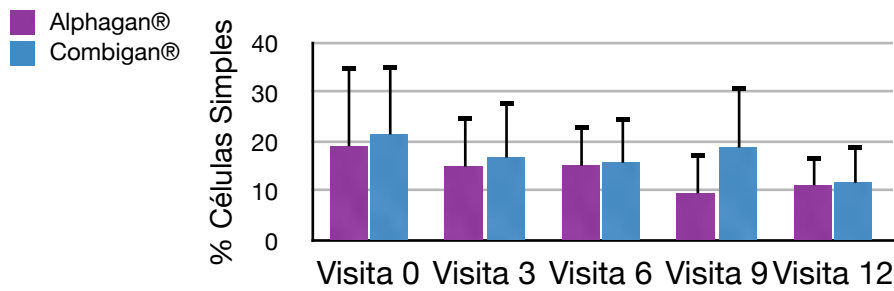


Figura 56. Variaciones observadas en el porcentaje de células simples del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

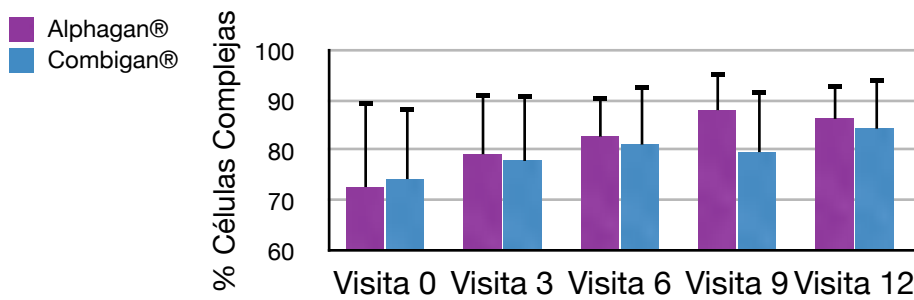


Figura 57. Variaciones observadas en el porcentaje células complejas del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

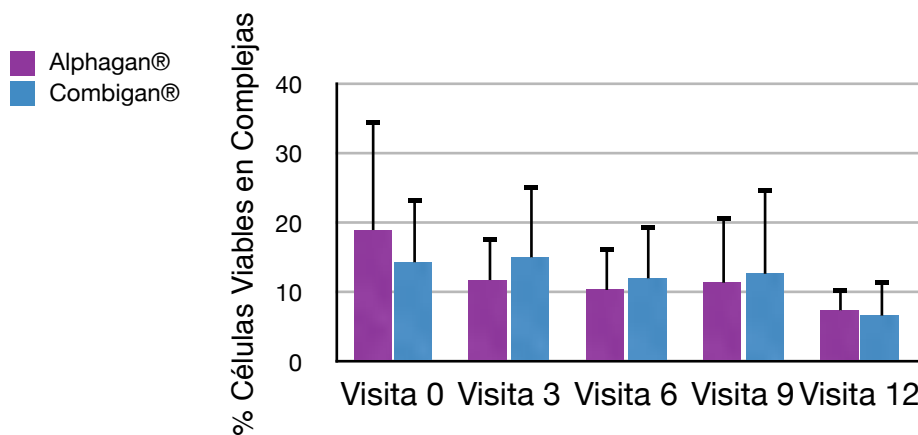


Figura 58. Variaciones observadas en el porcentaje células viables en células complejas del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

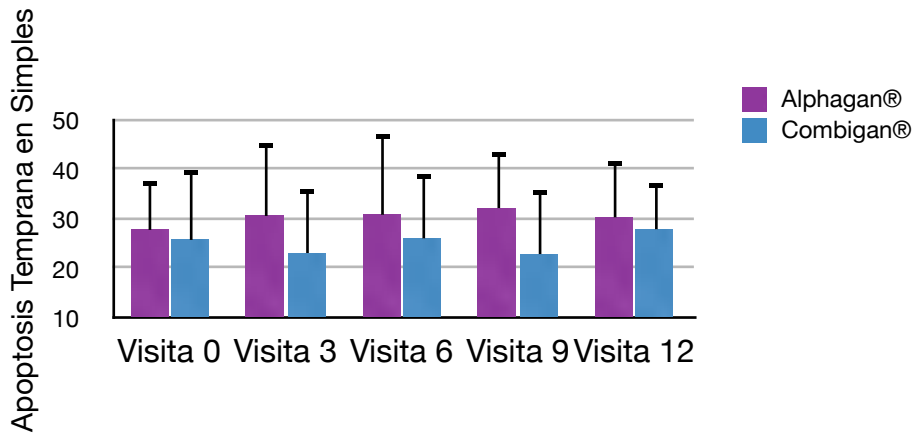


Figura 59. Variaciones observadas en la apoptosis temprana en células simples del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

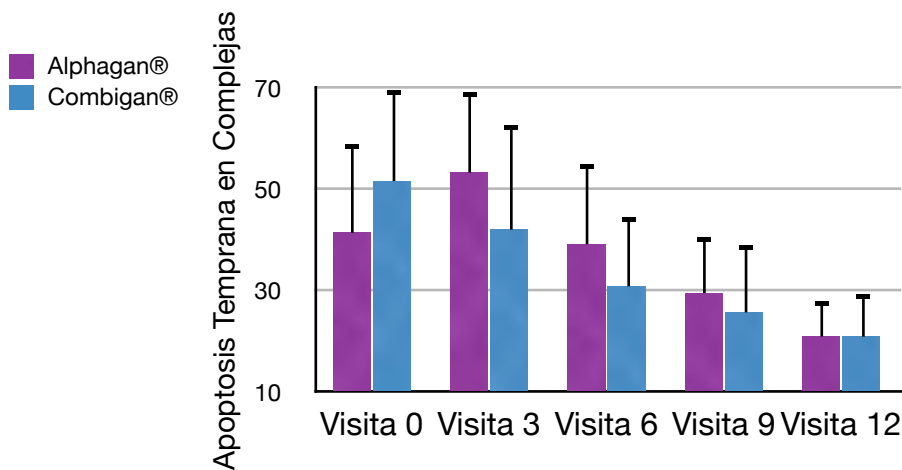


Figura 60. Variaciones observadas en la apoptosis temprana en células complejas del epitelio conjuntival de los sujetos del estudio

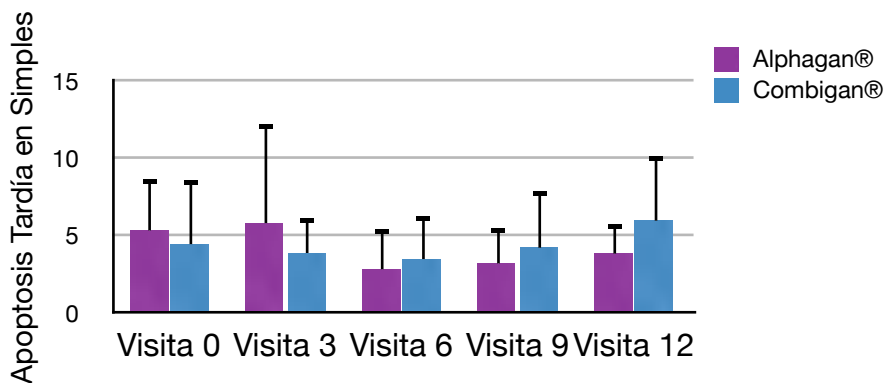


Figura 61. Variaciones observadas en la apoptosis tardía en células simples del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

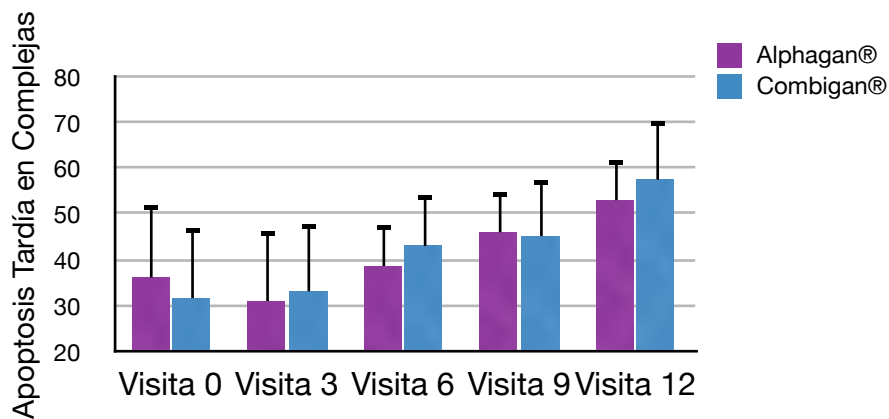


Figura 62. Variaciones observadas en la apoptosis tardía en células complejas del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

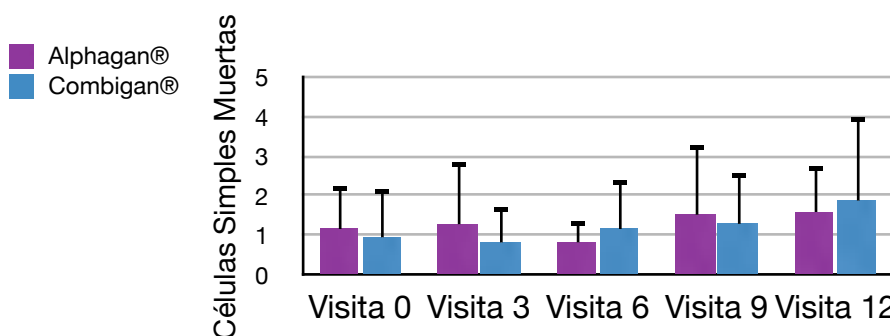


Figura 63. Variaciones observadas en las células simples muertas del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

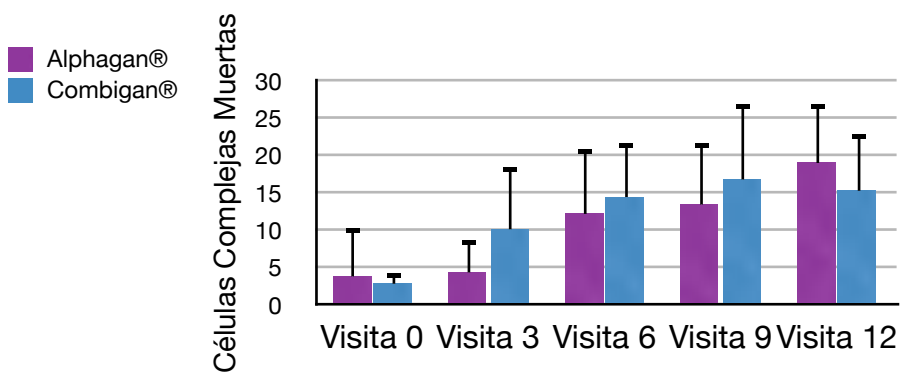




Figura 64. Variaciones observadas en las células complejas muertas del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

### Ciclo celular

Se observaron cambios estadísticamente significativos en al menos uno de los dos tipos de fármacos y en al menos una de las revisiones, respecto a la visita inicial en los siguientes parámetros de ciclo celular. Tabla 20, Figuras 65-69:

-% Células fase crecimiento o preciclo (G0/G1): se observó un aumento en las visitas 3, 6, 9 y 12 para Alphagan®, y en las visitas 9 y 12 para Combigan®.

-% Células fase síntesis (S): se observó un aumento en las visitas 3 y 6 para Alphagan®, y un descenso en la visita 12 para Combigan®.

-% Células fase proliferación (G2/M): se observó un descenso en la visita 9 para Alphagan®, y un descenso en la visita 12 para Combigan®.

-Índice de proliferación o MPI: se observó un descenso en la visita 9 para Alphagan®, y para Combigan® un ascenso en la visita 6 y un descenso en la visita 12.

Se observaron cambios estadísticamente significativos entre ambos tipos de fármacos en al menos una de las revisiones, en los siguientes parámetros de ciclo celular. Tabla 20, Figuras 65-69:

-% Células fase crecimiento o preciclo (G0/G1): se observó un aumento en la visita 9 para Alphagan®.

-% Células fase síntesis (S): se observó un descenso en la visita 9 para Combigan®.

-% Células fase proliferación (G2/M): se observó un ascenso en la visita 6 y un descenso en la visita 9 para Combigan®.

-Índice de proliferación o MPI: se observó un descenso en la visita 9 para Combigan®.

Tabla 20. Variaciones observadas en los parámetros de Ciclo celular del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

Ciclo celular		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12
	Sujetos	24	22	18	19	20
	Media	71,75	86,65	85,18	89,09	86,63

Ciclo celular			Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12	
Alphagan®	% células fase G0/G1	DT	21,35	5,97	5,67	4,88	5,01	
		p-valor		0,027*	0,030*	0,001* 0,01#	0,040*	
	% células fase S	Sujetos	24	22	18	19	20	
		Media	3,91	4,35	4,98	3,31	3,98	
		DT	1,11	0,93	2,03	1,2	1,12	
		p-valor		0,041*	0,012*			
	% células fase G2/M	Sujetos	24	22	18	19	20	
		Media	10,54	9,01	9,84	7,59	9,39	
		DT	3,26	5,33	4,38	3,8	4,15	
		p-valor				<0,001*		
	MPI	Sujetos	24	22	18	19	20	
		Media	14,45	13,35	14,82	10,91	13,37	
		DT	3,31	5,97	5,67	4,88	5,01	
		p-valor				0,001*		
	Combigan®	% células fase G0/G1	Sujetos	29	23	22	21	21
			Media	74,85	84,84	81,81	86,57	88,28
DT			19,39	6,12	5,51	3,14	4,01	
p-valor						0,003*	<0,003*	
% células fase S		Sujetos	29	23	22	21	21	
		Media	4,26	4,55	5,23	4,02	3,75	
		DT	1,37	1,41	1,37	0,84	1,05	
		p-valor				0,03#	0,030*	
% células fase G2/M		Sujetos	29	22	22	21	21	
		Media	10,62	10,61	12,95	9,41	7,96	
		DT	4,41	5,12	4,77	2,78	3,35	
		p-valor			0,04#	0,04#	<0,003*	
		Sujetos	29	23	22	21	21	

Ciclo celular		Visita 0	Visita 3	Visita 6	Visita 9	Visita 12
MPI	Media	14,88	15,16	18,19	13,43	11,72
	DT	5,34	6,12	5,51	3,14	4,01
	p-valor			0,047*	0,01#	0,001*

\* =  $p < 0.05$  (diferencia visita n-visita 0 en cada grupo)

# =  $p < 0.05$  (diferencia entre ambos grupos en esa visita)

Al analizar los resultados de los parámetros de ciclo celular en el epitelio conjuntival de los sujetos del estudio se pudo observar que el porcentaje de células en crecimiento o células en preciclo (fase G0/G1) aumento en todas las visitas para los sujetos tratados con Alphagan® (visitas 3, 6, 9 y 12); mientras que en los sujetos tratados con Combigan® solo se pudo observar en las visitas 9 y 12.

El comportamiento del porcentaje de células en fase de síntesis (fase S) fue diferente, ya que se pudo observar un aumento para los sujetos tratados con Alphagan® en las visitas 3 y 6; mientras que para los tratados con Combigan® se observó un descenso en la visita 12.

El porcentaje de células en fase proliferativa (fase G2/M) sufrió un descenso en ambos grupos de estudio, siendo mayor en la visita 9 para los tratados con Alphagan®, y en la visita 12 para los que recibieron tratamiento con Combigan®.

El índice de proliferación o MPI reflejó un descenso en la visita 9 para los sujetos tratados con Alphagan®, mientras que para los tratados con Combigan® ascendió en la visita 6 y descendió en la visita 12.

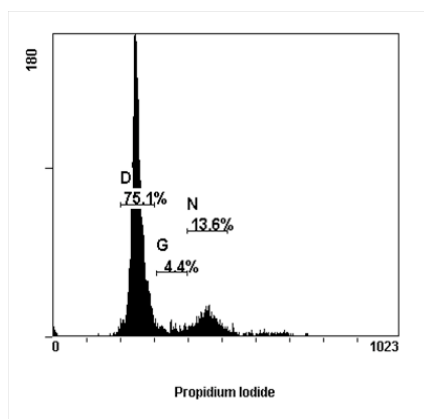


Figura 65. Ejemplo de histograma de citometría de flujo sobre el que se realiza el estudio del ciclo celular en sujetos participantes en el estudio. (D: células en fase G0/G1; G: células en fase S; N: células en fase G2/M) (Elaboración propia)

Al comparar un fármaco con el otro se observó que los pacientes tratados con Alphagan® solo sufrieron cambios en un parámetro de ciclo celular, el porcentaje de células en fase de crecimiento o preciclo (fase G0/G1), parámetro que mostró un ascenso en la visita 9; en cambio, aquellos sujetos tratados con Combigan® mostraron cambios en el resto de parámetros de ciclo celular analizados, así, el porcentaje de células en fase de síntesis (fase S) descendió en la visita 9; el porcentaje de células en fase proliferativa (fase G2/M) se elevó en la visita 6 y descendió en la visita 9; y, por último, el MPI descendió en la visita 9.

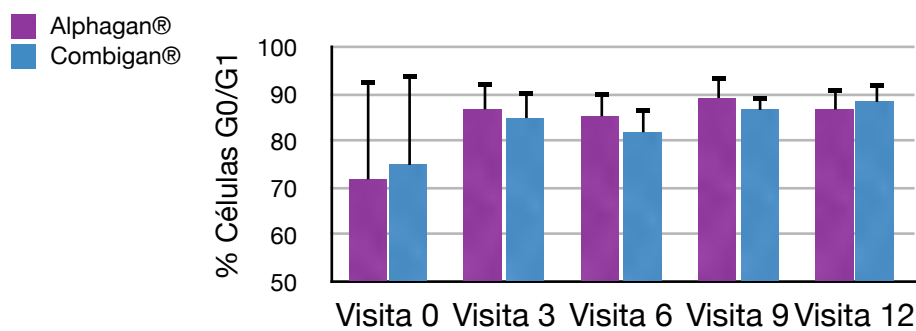


Figura 66. Variaciones observadas en el porcentaje de células en fase de crecimiento o preciclo (fase G0/G1) del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

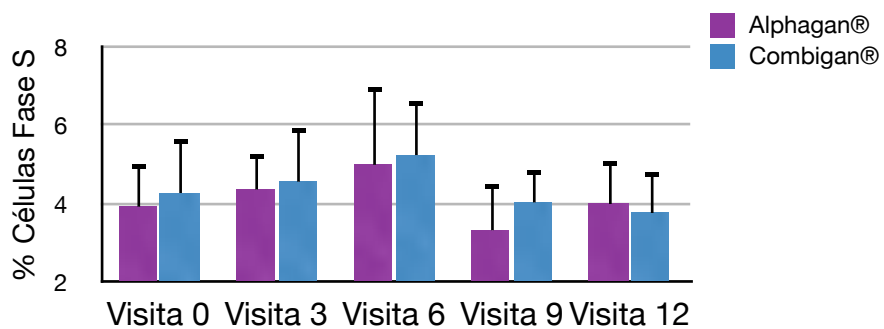


Figura 67. Variaciones observadas en el porcentaje de células en fase síntesis (fase S) del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

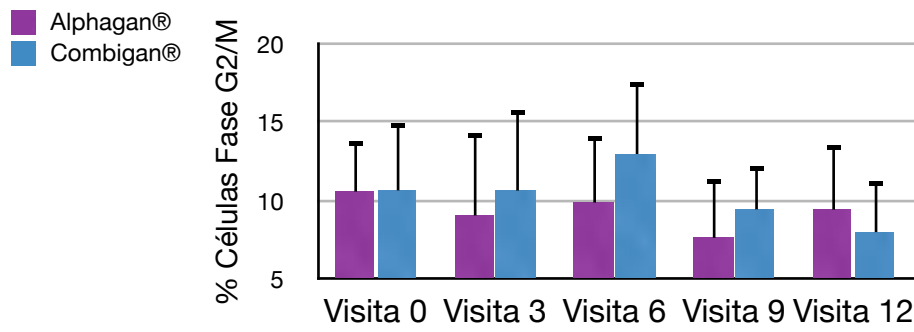


Figura 68. Variaciones observadas en el porcentaje de células fase proliferativa (fase G2/M) del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

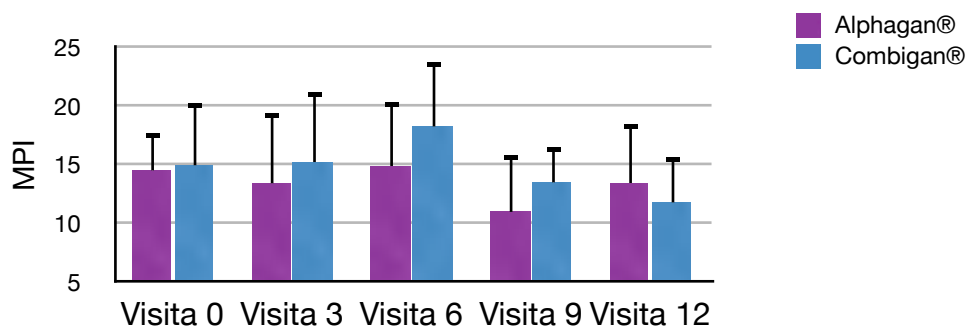


Figura 69. Variaciones del índice de proliferación (MPI) de células del epitelio conjuntival en los sujetos del estudio

En esta última figura (70 a y b)) se muestran, a modo resumen, los principales cambios observados en las variables estudiadas en función del tratamiento.

VARIABLES	V3	V6	V9	V12
SODQ				
NIBUT				
T.SCHIRMER				
E.OXFORD				
E.VAN BIJSTERVALD				
PIO				
E.NELSON				
Adra2A				
Adra2B				
Adra2C				

No hay cambios frente al momento 0

Tendencia (no hay diferencias significativas)

Hay diferencias con el momento 0

Cuando la flecha está cruzada por 2 barras es que hay diferencias entre tratamientos

El sentido de la flecha es para indicar la tendencia del cambio frente al punto 0

La altura de las flechas indica si los parámetros están más elevados o más bajos en un determinado grupo de tratamiento

El color es **Alpahagan®** y **Combigan®**

Figura 70.a) Variaciones de las Variables Estudiadas I.

VARIABLES	V3	V6	V9	V12
<b>CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS*</b>				↑
<b>% LINFOCITOS Tc</b>	↑	↑	↑	↑
<b>% CÉLULAS SIMPLES</b>	↓	↓	↓	↓
<b>% CÉLULAS COMPLEJAS</b>	↓	↓	↓	↓
<b>APOPTOSIS TEMPRANA (CÉLULAS COMPLEJAS)</b>	↑	↓	↓	↓
<b>APOPTOSIS TARDÍA (CÉLULAS COMPLEJAS)</b>	↓	↑	↑	↑
<b>% CÉLULAS FASE G2/M</b>	↓	↓	↓	↓
<b>MPI</b>	↓	↑	↓	↓

\*(eotaxina;fractalquina;IP-10;Rantes;IL-6;IL-8;VEGF;IL-1β1)

== No hay cambios frente al momento 0

↓ Tendencia (no hay diferencias significativas)

⌘ Hay diferencias con el momento 0

⌘ Cuando la flecha está cruzada por 2 barras es que hay diferencias entre tratamientos

El sentido de la flecha es para indicar la tendencia del cambio frente al punto 0

La altura de las flechas indica si los parámetros están más elevados o más bajos en un determinado grupo de tratamiento

El color es **Alpahagan®** y **Combigan®**

Figura 70.b) Variaciones de las Variables Estudiadas II



## 5. DISCUSIÓN



## **5. DISCUSIÓN**

### **5.A. GRUPOS MUESTRALES. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

Las edades de los sujetos a estudio seleccionados, comprendidas entre los 40 y los 85 años, se consideraron como las más apropiadas ya que en esta franja de edad se encuentra el 85% de la población con glaucoma, lo que nos permitiría conocer las alteraciones originadas en la superficie ocular de la población usuaria de colirios antiglaucomatosos. (1)

No se seleccionó el sexo de los sujetos en el momento del estudio, ya que, no se consideró, a priori, una variable determinante (1), dato que luego se confirmó tras el análisis estadístico. Tan solo encontramos una correlación muy débil entre el sexo mujer, donde fue más alto el valor de la PIO y de las citocina VEGF; y para los hombres con un valor más alto para la citocina IL-8. En ambos casos no hemos encontrado correlación con clínica con lo descrito previamente en la bibliografía, y quizá estos datos puedan ser debidos a que se trataba de un grupo reducido de sujetos, y necesitaríamos, por tanto, grupos más amplios para poder establecer conclusiones.

La elección de sujetos previamente no tratados con terapia tópica permitió estudiar superficies oculares no dañadas, en las que el único cambio que se iba a introducir era la utilización de un tipo de colirio u otro. Por ello, en un principio, las variaciones que apareciesen a lo largo del seguimiento, podrían ser atribuidos sólo al uso de las mismos, al tener controlados otros factores que afectarían a la SO. En línea con diversos artículos ya publicados, el uso de cualquier medicación tópica coadyuvante también fue rechazado, ya que se ha descrito que existen diversos tratamientos tópicos que contienen conservantes con capacidad de alterar la superficie ocular, sobre todo cloruro de benzalconio, y por tanto su uso podría influir en los resultados del estudio. (71,72)

En esta misma línea, hay publicaciones que recogen datos sobre los efectos que el consumo de ciertos fármacos puede producir en la composición de película lagrimal, y por tanto en la homeostasis de la superficie ocular; por tanto a la hora de seleccionar los pacientes se tuvieron en cuenta sus antecedentes sistémicos. (73,74)

### **5.B. VARIABLES CLÍNICAS**

Los colirios elegidas fueron Alphagan® y Combigan®, ya que son dos de los más utilizados en el tratamiento del glaucoma, representando un tercio de los tratamientos habituales.(1)

La única diferencia notable entre los dos tipos de colirio fue la presencia de timolol, un beta-bloqueante, que está presente sólo en el Combigan®; y que según algunos estudios aun no publicados (datos de Allergan Inc.) podría reducir las posibles reacciones inflamatorias originadas

por la brimonidina. Esto hace que exista, en el grupo II, una variable que pueda influir en algunos parámetros como son las tinciones corneales, la lisozima, la encuesta clínica estandarizada o los linfocitos intraepiteliales, la viabilidad-apoptosis o fases del ciclo celular de las células conjuntivales.

Para intentar homogeneizar todavía más la muestra, se instruyó a los individuos para que utilizaran los colirios según una pauta de tiempo similar en todos los casos.

Además, la realización de las pruebas diagnósticas se llevo a cabo siempre en el mismo orden (Tabla 3), para que cada una de ellas modificase lo menos posible a la siguiente (73), y siempre en el mismo intervalo de horas del día para evitar los cambios circadianos que se producen en ciertos parámetros, como la PIO.

### **5.B.1 Encuesta Clínica Estandarizada. *Symptoms of Discomfort Questionnaire (Allergan Protocol)***

La valoración de los síntomas de SOS es uno de los parámetros más ampliamente utilizados y que aparece en la mayoría de las definiciones de esta entidad.(75-79)

Este test es uno de los más utilizados en el diagnóstico del SOS senil o postmenopáusico.(78,79) Sin embargo, su empleo en el SOS secundario a uso colirios no está tan extendido.

El análisis de las respuestas se realizó individualmente y mediante la suma de cada una de las puntuaciones de ellas, ya que existen preguntas claves como la percepción por parte del usuario de síntomas de sequedad.(79)

Los resultados obtenidos parecen confirmar que el uso de colirios antiglaucomatosos no aumenta la sintomatología de SOS en los pacientes que hemos estudiado.

En los dos grupos de tratamiento se encontraron diferencias estadísticamente significativas a los 6 meses de seguimiento, donde para ambos fármacos, el valor de la encuesta era mucho mayor en la visita 0; por lo tanto, parece que ambos fármacos mejoran la sintomatología percibida de ojo seco. Este dato podría explicarse por el efecto vasoconstrictor de la brimonidina (80); o bien, podría ser por el “sesgo psicológico” que sufre el paciente al sentirse estudiado y tratado dentro de un estudio clínico. En cualquier caso, no debe olvidarse que los pacientes que no toleraron los fármacos, abandonaron el estudio. En la visita 9, los pacientes que tenían asociado un beta-bloqueante se encontraban, incluso, menos sintomáticos, hecho que ratificaría la hipótesis de que el timolol mejoraría la tolerancia del alfa-2 agonista.

Estas diferencias tienen correlación, parcial o total, con los parámetros clínicos y de laboratorio de ojo seco estudiados, tal y como se verá más adelante.

### **5.B.2. NIBUT**

La introducción de instrumental que obtiene la lectura del tiempo de ruptura lagrimal sin la necesidad de instilar una gota de fluoresceína, permite la determinación de valores más próximos a la realidad sin la influencia del colorante.(81,82) El rango de valores es también mayor y está menos tipificado, ya que existe menor experiencia. No obstante, la sensibilidad y especificidad son muy altas, lo que permite considerarlo como una de las pruebas diagnósticas más importantes en el SOS. (83,84)

La determinación del NIBUT se realizó en el momento de la ruptura de alguno de los círculos proyectados en la córnea, y no cuando había una distorsión de las figuras, para evitar lecturas demasiado bajas.

En este estudio, ha existido un empeoramiento del NIBUT a lo largo del seguimiento sólo en el Grupo II. No obstante, no se pueden comparar los dos grupos por tener valores estadísticamente significativos diferentes ya en la visita 0; aunque si se aprecia una tendencia clara de que no existen diferencias entre ambos tratamientos. Para esta diferencia a tiempo “cero” en el NIBUT no encontramos explicación objetiva, ya que ambos grupos fueron similares en edad y sexo; quizá esta diferencia pueda ser debida a que se trató de un estudio con un número pequeño de pacientes.

Otro hecho claro es que el efecto de los colirios sobre el NIBUT, en el Grupo II, comienza a ser significativo a partir del tercer mes de tratamiento, y alcanzan su valor mayor a los 9 ó 12 meses del mismo; este dato confirmaría que el daño que este tipo de preparados produce en la superficie ocular no es inmediato sino que requiere un tiempo para lograr su efecto; y este factor temporal no lo debemos olvidar porque este tipo de patología requiere un tratamiento prolongado y, en muchas ocasiones, de por vida.

Esta contradicción entre los resultados obtenidos en la encuesta de síntomas (valoración subjetiva) y el NIBUT (valoración fisiológica), vuelve a poner de manifiesto la falta de concordancia entre las diferentes pruebas diagnósticas que se utilizan en la práctica clínica para el SOS (79).

### **5.B.3. Test de Schirmer con anestesia**

El test de Schirmer continúa siendo una de las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de SOS.(75,85-87) Su realización sin anestesia, el denominado test de Schirmer I, es mucho más variable e influenciado por estímulos externos que el practicado con anestésico o test de Jones. La ventaja de este test con anestesia es que intenta eliminar la secreción lagrimal refleja; y por tanto, el dato obtenido es mucho más constante a lo largo del tiempo y menos influenciado por la sensibilidad corneal (87), motivo por el que fue realizado de este modo en el presente estudio.

En los dos grupos de colirio hubo una lenta disminución en el valor del test a lo largo del tiempo de tratamiento; disminución que fue significativa a partir del sexto mes para los sujetos tratados con Combigan®, mientras que en los sujetos tratados con Alphagan® este descenso no fue evidente hasta el mes 12. Como explicación a este comportamiento diferente entre ambos grupos, no hay que olvidar que el timolol, por sí mismo, puede generar una hiposecreción lagrimal (6,7), por lo que difícilmente podría mejorar el efecto de la brimonidina.

De nuevo, y como en el caso del NIBUT, se observa una discordancia entre la evolución de este parámetro y la de los valores obtenidos en la encuesta de discomfort, poniendo de manifiesto, otra vez, la falta de correlación entre las pruebas diagnósticas de ojo seco.(79)

### **5.B.4. Tinción con fluoresceína. Escala de Oxford**

Entre los distintos patrones utilizados para la cuantificación de la tinción en la superficie ocular, se seleccionó el esquema o escala de Oxford, ya que es una técnica ampliamente utilizada para la valoración del SOS,(88-90) y por tanto, podría ser de ayuda para diferenciar los patrones ya descritos de tinción en SOS, de los que pudiesen aparecer por las lesiones debidas a la aplicación de medicación tópica antiglaucomatosa.

En este estudio se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos con respecto al momento inicial en la visita 3, ya que en este momento el valor de la tinción fue más alto, reflejándonos un empeoramiento objetivo en la superficie ocular de los sujetos; y se apreció diferencias entre los dos grupos de tratamiento en la visita 9, siendo, de ellos, más lesivo el Alphagan®, posiblemente, y de nuevo, por el efecto protector que tendría el timolol (solo presente en el Combigan) sobre la superficie ocular.

No se observan diferencias, en cuanto al patrón de tinción en los sujetos tratados con fármacos antiglaucomatosos, respecto a los ya descritos para SOS senil o postmenopáusico. (79,91,92)

### **5.B.5. Tinción con rosa de Bengala. Escala Van Bijstervald**

Entre los distintos patrones utilizados para la cuantificación de la tinción en la superficie ocular, el segundo seleccionado fué el esquema o escala de van Bijstervald, por las mismas razones que ya se comentaron para la elección de la escala de Oxford.(88-90)

El rosa de Bengala tiñe las células vivas, las degeneradas o muertas, los filamentos y el moco. En condiciones de integridad de la película lagrimal, sustancias como la albúmina, la lactoferrina, la lisozima y sobre todo las mucinas, bloquean al colorante y no permiten su captación. Por ello, el rosa de Bengala es un indicador indirecto de la integridad de la película lagrimal. (93,94)

El patrón más típico de captación del colorante en el SOS, y que, también, más comúnmente apareció en nuestro estudio, fue la tinción interpalpebral de córnea y conjuntiva.(94)

En este estudio, apenas hubo aumento de la tinción a lo largo del seguimiento, si bien, en el mes 12 hay más captación de colorante en el grupo de Alphagan®, lo que de nuevo redundaría en el posible efecto protector del beta-bloqueante timolol, del que carece este fármaco.

No obstante, el que las diferencias sean tan tardías sería debido, posiblemente, a que ambos preparados tienen poco efecto nocivo sobre la película lagrimal.

### **5.B.6. PIO**

La toma de la presión intraocular permitió valorar, aunque no era el objetivo primario del estudio, si el fármaco era eficaz o no en su función primera, el descenso de la PIO en los pacientes.

Se observó que ambos fármacos eran eficaces en el descenso de la PIO a partir del tercer mes de tratamiento, ya que lograron disminuir los valores de PIO en todas las visitas respecto a la visita inicial (visita 0); parece que ambos producen su máximo efecto hipotensor de un modo precoz, a los tres meses; si bien, de ellos, Combigan® produce un descenso mayor de PIO (Combigan®: 6,12 mmHg y Alphagan®: 3,89 mmHg); este dato es comprensible ya que Combigan®, al tratarse de una asociación de dos fármacos, debe tener una potencia hipotensora mayor.(6)

Al analizar el resto de visitas, pudimos observar que este descenso “brusco” de la PIO se suaviza en la visita 6 para ambos fármacos, e incluso asciende a partir de la visita 9 (visitas 9 y 12), aunque siempre manteniendo valores inferiores respecto a la visita inicial; por tanto, podemos afirmar que ambos fármacos cumplen su función hipotensora de forma eficaz

Si correlacionamos este comportamiento en la PIO con lo sucedido en otros parámetros como el NIBUT, Schirmer, fenotipo de IELs, viabilidad o ciclo celular, que también muestran comportamientos peores a partir de la visita 9 ó 12, podríamos plantear la posibilidad de realizar tratamientos cortos con periodos de descanso, ya que en estos periodos cortos es donde se aprecia menos daño en superficie ocular y donde se logra un mayor descenso de la PIO.

## **5.C.VARIABLES DE LABORATORIO**

### **5.C.1. Lisozima lagrimal**

La concentración de esta enzima suele estar disminuida en los pacientes con SOS (fundamentalmente en el subtipo hiposecretor) (75,95), siendo una de las pruebas diagnósticas de laboratorio más sensibles y específicas.

La técnica de recolección de la lágrima, mediante capilares o papel, normalmente no suele afectar a la determinación de la concentración.(96)

Las condiciones de recogida con o sin anestesia no suelen afectar a la proporción global de la enzima en la lágrima, aunque si se hace con anestesia, la muestra puede estar diluida. (96,97). Por lo que en este estudio se realizó la recogida previa a la instilación de anestésico tópico.

La determinación de la concentración de lisozima se realizó mediante inhibición de crecimiento bacteriano en placas, método que cuenta con una dilatada experiencia y que resulta igual de fiable que la determinación mediante otros métodos enzimáticos o inmunológicos. El procedimiento es sensible a niveles bajos de enzima, relativamente rápido y sólo necesita pequeñas cantidades de lágrima. (95)

En este estudio, la concentración de lisozima sufrió ligeros cambios a lo largo del seguimiento temporal, pero sin alcanzar éstos diferencias significativas; cuando se analizó de forma aislada cada fármaco, se pudo observar que en el caso de los sujetos tratados con Alphagan® había un ligero aumento de la concentración en las visitas 3 y 6, para luego empeorar a niveles inferiores a los de la visita 0; en cambio, en los sujetos tratados con Combigan® el descenso en la concentración fue muy marcado en las visitas 3 y 9, observándose una mejoría en las visitas 6 y 12, siendo este último valor ligeramente más elevado que en los sujetos del grupo I. En cualquier caso estos valores no fueron estadísticamente significativos, y en ambos grupos los niveles de lisozima se mantuvieron dentro del estándar de normalidad

La lisozima, que es secretada esencialmente por la glándula lagrimal principal, puede sufrir cambios en su concentración debido a la afectación del arco reflejo.(95) La disminución de la

sensibilidad en la superficie ocular provocada por el uso de colirios podría ocasionar un descenso en la concentración de la lisozima, con la consiguiente alteración de esta vía de producción lagrimal; la puesta en marcha de dicho mecanismo podría justificar los cambios de concentración hallados en nuestro estudio.

## **5.C.2. Citología por impresión conjuntival (CIC)**

### **5.B.2.1. CIC para microscopía óptica. Estadiaje de Nelson**

La citología por impresión conjuntival es uno de los métodos más usados en el apoyo diagnóstico de las patologías de la superficie ocular, como en el SOS o como en los cambios que se producen en la superficie ocular por el porte de lentes de contacto (LC).(64)

Desde su introducción en la clínica hace más de 25 años por Egbert,(98) se ha intentado estandarizar la selección del papel de filtro, la técnica de recogida de muestras, la tinción de las mismas y la clasificación de los distintos estadios de afectación de la superficie ocular.(99)

El filtro de PES utilizado en este estudio permite una mayor recogida de células de la superficie ocular,(100) sin la necesidad de emplear métodos que incrementen la presión sobre el filtro, como sucede al utilizar los de acetato de celulosa.

La zona elegida para la toma de la muestra fue la conjuntiva bulbar inferior, que es la más afectada en el SOS.(101)

El estadiaje de las células epiteliales es el más comúnmente utilizado,(102) con una pequeña modificación, ya que se decidió separar las células epiteliales del conteo de las células caliciformes para poder disponer de un dato adicional. Existen otras clasificaciones como la de Tseng, pero son más complejas.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los cambios ocurridos en el estadiaje epitelial; pero sí se detectó un comportamiento diferente en relación al fármaco utilizado, ya que los sujetos tratados con Alphagan® mostraron unos valores un 25% más bajos (células menos alteradas) en la visita 12 que en la 0 (células más sanas); mientras que los tratados con Combigan® fueron un 33% más altos (células más alteradas) en la visita 12 que en la 0.

Parece, por tanto, que cuando se estudia la superficie ocular mediante CIC, es sensiblemente más tóxico el Combigan®. Este hecho ya fue demostrado por este grupo de investigación al poner de manifiesto la gran metaplasia epitelial originada por el timolol.(7)

La aparición de condensaciones en la cromatina nuclear de las células epiteliales en forma de serpiente o “*snakes*” ocurre en sujetos normales, si bien, es mucho mayor su número en los pacientes con SOS.(102,103) En cambio, en este estudio se observaron muy pocas de estas alteraciones, dato que quizá podría ser explicado porque el tiempo de seguimiento no fue suficiente para que la célula llegase a mostrar dichas imágenes en correlación con la apoptosis por estrés oxidativo o a un fallo en la técnica de análisis que no permitió observarlas o a que estas alteraciones corresponden con un SOS severo, y en estos pacientes el tratamiento no logra alterar tan profundamente su SO, presentando la mayoría de ellos un SOS leve. (104,105)

#### **5.C.2.2. CIC para cuantificación genes de receptores alfa-2 adrenérgicos en conjuntiva bulbar**

La PCR a tiempo real combina tecnologías de fluorescencia y amplificación, lo que permite realizarla de manera cuantitativa y cualitativa.

La presencia de los receptores alfa-2 ha sido descrita en diversos tejidos humanos (106-108) y en diferentes especies animales, incluyendo la rata,(109) el conejo,(109) el ternero(110) y el cerdo(111). Alguno de los tejidos oculares en los que se han encontrado son el epitelio ciliar, el músculo ciliar, el epitelio del iris y la retina (106-111).

La activación de los receptores alfa-2 desencadena una serie de funciones en los ojos de los vertebrados, como son la reducción de la presión ocular,(112,113) la protección del nervio óptico y un aumento de la supervivencia de las células ganglionares de la retina.(114) Estas son las principales razones por las que los alfa-2 agonistas adrenérgicos, como la apraclonidina y la brimonidina, son efectivos para tratar la hipertensión ocular en pacientes con glaucoma.(2,112,114) Los receptores alfa-2 participan en los efectos que tienen la brimonidina y la clonidina en la conjuntiva. (112,113)

En los pacientes tratados de forma crónica con estos compuestos se desarrolla sequedad de la superficie ocular e irritación. Se piensa, que el efecto de los alfa agonistas sobre los receptores alfa-2 en la conjuntiva pueden ser los responsables de los síntomas que producen estos tratamientos: conjuntivitis foliculares, sensación de cuerpo extraño y picor. Estos signos son descritos como una reacción alérgica que se produce como consecuencia de los tratamientos con alfa-2 agonistas. (115-117)

Diferentes estudios sugieren que los alfa-2 agonistas tienen diversos efectos en los distintos receptores alfa-2. En estudios en animales, se ha encontrado que la brimonidina reduce la presión ocular porque disminuye el flujo del humor acuoso y aumenta la salida de flujo uveoescleral.



(112,113) Parece ser que la disminución del flujo del humor acuoso se debe a la actuación sobre el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar.(112,113) Para entender los mecanismos de acción que sigue este compuesto y sus diferencias con el preparado brimonidina-timolol, Combigan®, se debe conocer la distribución de estos receptores en los diferentes tejidos oculares. Pero además, es necesario también considerar el efecto que tienen estos tratamientos sobre la regulación de la expresión de los distintos receptores alfa-2.

La expresión génica del receptor alfa-2A en conjuntiva se ve aumentada a los 12 meses de tratamiento, en ambos grupos, con respecto a los controles (sujetos en la visita 0); este dato sugeriría que, tanto la brimonidina como el preparado brimonidina-timolol, tendrían un efecto en la expresión de los receptores alfa-2A. Por otro lado, la expresión de este receptor fue siempre mayor en los sujetos tratados con Combigan® (aunque sin llegar a alcanzar la significación estadística), por lo que se podría decir que el preparado de brimonidina-timolol estimularía la síntesis de este subtipo de receptores de forma más fuerte que cuando actúa la brimonidina sola.

La expresión génica para el receptor alfa-2B fue, también en ambos grupos, mayor a los 12 meses de tratamiento que en los controles; lo que, de nuevo, indicaría que tanto la brimonidina como el preparado brimonidina-timolol tendrían un efecto en la expresión de los receptores alfa-2B. En este caso, y a diferencia de los receptores alfa-2A, los sujetos tratados con Alphagan® presentaron una expresión mayor que los tratados con Combigan®.

La expresión génica para el receptor alfa-2C también aumenta en ambos grupos en la visita 12 respecto a a la visita 0; pero a diferencia de los dos receptores anteriores, en este caso no hay diferencias de expresión entre ambos fármacos. Esto indicaría que la expresión de este subtipo de receptor variaría con los tratamientos, pero lo haría por una vía diferente a los dos anteriores receptores.

El análisis de estos datos sugeriría que los tres tipos de receptores se ven afectados por el uso de la medicación tópica antiglaucomatosa, pero que no lo harían de igual forma ni a igual nivel; así, el receptor alfa-2A al mostrar mayor expresión en lo sujetos tratados con Combigan® sugeriría que puede mostrar más sensibilidad al timolol; mientras que el receptor alfa-2B mostraría más sensibilidad a la brimonidina ya que su expresión fue mayor mayor en los sujetos tratados sólo con Alphagan®; en cambio, la expresión del receptor alfa-2C no no se altera de modo diferencial por ninguno de los dos principios activos.

En cualquier caso, lo que está claro es que ambos preparados aumentan la expresión de estos receptores alfa-2C, de una manera muy similar a lo que ocurre cuando se incuban células conjuntivales con Interferón o con TNF- $\alpha$  (3,4). El hecho de que no se observen diferencias

estadísticamente significativas entre los dos grupos posiblemente sea debido, bien a que la muestra es pequeña y/o a que el tiempo de seguimiento sea corto; sin embargo, parece que hay tendencia a que el incremento sea mayor en los pacientes tratados sólo con brimonidina, Alphagan®, como ocurre en el caso del receptor alfa-2B.

En definitiva, este hecho podría explicar, en parte, los fenómenos inflamatorios que tienen lugar en pacientes tratados con estos preparados; aunque necesitaríamos nuevos estudios para confirmarlo.

### **5.C.3. Citocinas y Quimiocinas**

Los pacientes tratados con fármacos tópicos antiglaucomatosos sufren cambios en su superficie ocular, como hiperemia, descenso en el tiempo de ruptura lagrimal o leve queratitis, entre otros; la inflamación parece ser la causante de estos signos clínicos y podría ser un factor de riesgo importante en el fallo de dicha terapia.

Parece ser que las citocinas jugarían un papel clave en esta respuesta inmune e inflamatoria, al ser capaces de regular la activación, diferenciación y proliferación de las células inmunocompetentes de la conjuntiva(31-34). Además, se han encontrado niveles elevados de citocinas inflamatorias en lágrima de distintas patologías de la superficie ocular como la alergia, la rosácea o el SOS. (35-37)

En los últimos 25 años, el uso médico de las citocinas se ha desarrollando de un modo exponencial como agentes diagnósticos, pronósticos y terapéuticos.(118) Por ello, la medida de citocinas en lágrima podría ayudar a identificar el patrón inflamatorio de la superficie ocular de los pacientes sometidos a tratamiento tópico antiglaucomatoso. Se sabe que la composición de lágrima varía al iniciar cualquier tipo de tratamiento tópico o sistémico, por lo que disponer de un medio objetivo capaz de evidenciar estas variaciones podrían ayudar a conocer el estado de actividad inflamatoria de una manera objetiva y precoz, previa a la aparición de alteraciones estructurales intraoculares. En los últimos años, se ha planteado la posibilidad de que existieran variaciones en los niveles de citocinas/quimiocinas en lágrima, lo cual ha sido demostrado en varios estudios llevados a cabo sobre estos pacientes. (38,119,120)

De las distintas moléculas analizadas en la lágrima de los sujetos a estudio con la tecnología Multiplex, se pudo observar que en la visita 12, y sólo en el Grupo I (pacientes tratados con Alphagan®), se produjo un aumento significativo de la concentración de eotaxina, fractalquina, IP-10, RANTES, IL-6, IL-8, VEGF e IL1β1; todas estas moléculas tienen como objetivo final aumentar la inflamación de origen celular y se encuentran de forma habitual en los procesos

inflamatorios en tejidos y/o de forma sistémica; alguna de estas moléculas también aparece elevada en procesos alérgicos. Estos datos podrían ayudar a comprender el patrón predominante de inflamación en este tipo de tratamientos, y que podría determinar la intolerancia al uso de dichos fármacos en algunos pacientes.(120)

Por los datos obtenidos en nuestro estudio parece claro que de los dos fármacos, sería el Alphagan® el más tóxico, ya que el Combigan®, lejos de producir un aumento de las citocinas, induce el descenso de IL-1beta y de IFN-gamma, que son dos de las más potentes citocinas pro-inflamatorias. Estos datos no se reflejan en el abandono clínico del fármaco, ya que en este estudio se retiraron más pacientes por intolerancia al Combigan® que al Alphagan®; estos datos podrían ser justificados porque la población del estudio es baja, por lo que serían necesarios nuevos estudios que involucraran a más pacientes y se pudieran monitorizar de un modo más prolongado. No obstante, no hay que olvidar que en el abandono juega un gran papel la percepción subjetiva de la tolerancia al fármaco por parte del paciente.

#### **5.C.4. Técnicas mínimamente invasivas. *Brush* Conjuntival. Caracterización celular por Citometría de Flujo**

La medicina siempre ha buscado el uso de métodos mínimamente invasivos para la obtención de células que, posteriormente, puedan ser viables para su uso en ensayos clínicos, estudios experimentales a nivel diagnóstico o incluso a nivel terapéutico. Estas técnicas han sido ampliamente utilizadas y están plenamente establecidas en la práctica clínica habitual de distintas especialidades médicas, como por ejemplo, en neumología para la obtención de células epiteliales traqueo-bronquiales,(121,122) en otorrinolaringología para la obtención de células epiteliales nasales,(123) en urología para la obtención de células uroteliales,(124,125) en hematología para la obtención de células endoteliales de cordón umbilical(126) o en digestivo para la obtención de células escamosas del esófago,(127) entre otras especialidades.

La gran ventaja que suponen estas técnicas es que puedan realizarse de manera repetitiva en los pacientes, sin ocasionarles grandes molestias.

En los últimos años, en el campo de la oftalmología, la técnica más utilizada para la obtención de células de la SO humana ha sido la CIC. (64,128-130) En este contexto, varios autores demostraron que la CIC era capaz de recoger un número muy elevado de células de la SO, concretamente de 2 a 6 capas superficiales de epitelio conjuntival.(64) Además se la ha considerado una técnica no invasiva. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que existe otra técnica,

mínimamente invasiva, denominada citología por cepillado o *brush* conjuntival, que es capaz de recoger mayor cantidad de células que la CIC, y que además lo hace directamente en suspensión, por lo que ofrece una gran ventaja para la posterior caracterización de las muestras obtenidas. (131,132) Se ha demostrado, también, que el cepillado es capaz de aislar poblaciones celulares más viables que la CIC manteniendo intacta la morfología de las células recuperadas, siendo éstas muy útiles para su posterior análisis, como por ejemplo, mediante citometría de flujo. (132-134) Por todo ello, se ha considerado oportuno elegir esta técnica para llevar a cabo el trabajo que aquí se presenta.

En los último veinte años, los métodos de análisis celular en medicina y biología han experimentado un gran avance, permitiendo que su uso se haya extendido de forma rápida desde los laboratorios de investigación básica hasta los clínicos. Dentro de este grupo de técnicas de análisis celular se encuentra la citometría de flujo (FC).

La FC se trata de una técnica de análisis celular multiparamétrico, cuyo principio básico consiste en hacer pasar células alineadas, es decir, de una en una, por un haz de láser focalizado. Esta técnica permite detectar parámetros relacionados con las características intrínsecas de las células, como son el tamaño y la complejidad, debido a su capacidad para medir la dispersión de la luz resultante de la interacción célula-láser. Además, es capaz de detectar señales de fluorescencia tanto en la superficie como en el citoplasma celular, procedentes de alguna interacción con compuestos fluoresceinados; la más utilizada sin duda la unión de un antígeno de la célula con un anticuerpo conjugado a un fluorocromo, proporcionando datos concretos sobre la densidad de la proteína por célula, definido como Intensidad de Fluorescencia Media o FMI, y que puede ser de gran ayuda a la hora de catalogar la célula objeto de análisis. La citometría de flujo ha permitido estudiar ampliamente diferentes mecanismos celulares como la proliferación, la migración, la diferenciación, el fenotipado o la muerte celular.

En el campo de la SO humana, la citometría de flujo se ha utilizado para estudiar diferentes patologías, especialmente aquellas de origen inmune o inflamatorio, como pueden ser el síndrome de ojo seco o las conjuntivitis alérgicas.(68-70) También se ha utilizado para la identificación de células madre (135-137) y, en su caracterización fenotípica, en el análisis de viabilidad celular y en el análisis de proliferación celular. (134)

Este amplio bagaje ha conducido a considerar esta técnica como la más adecuada para llevar a cabo la caracterización celular de la SO en este trabajo.

#### 5.C.4.1. Fenotipo de IELs

En nuestro estudio los resultados mostraron que la mayor parte de las células recuperadas de la conjuntiva humana de pacientes con glaucoma tienen estirpe epitelial, como ya quedó demostrado en anteriores estudios donde se observó que más del 95% de las células conjuntivales presentaban este fenotipo.(5,50,134) Sin embargo, se pudo observar que a pesar de este predominio epitelial, existía una pequeña población leucocitaria CD45(+) intercalada entre las distintas capas epiteliales de la conjuntiva, presente no sólo cuando tiene lugar el proceso inflamatorio, como se había indicado hasta ahora, sino que dicha población se encuentra presente de manera regular en la conjuntiva sana de pacientes con glaucoma (visita 0).

También observamos en la visita 0 que esta población leucocitaria está predominantemente compuesta de linfocitos T: 77,68% y 78,99%, seguida de linfocitos B: 21,58% y 20,08% y de linfocitos NK: 1,77% y 1,35%, respectivamente para los grupos que posteriormente fueron tratados con Alphagan® y Combigan®. Estos resultados concuerdan con lo anteriormente publicado, donde se indica el predominio de los linfocitos T sobre los B. (5,50,134) En la visita 9 se apreció un descenso significativo de linfocitos T totales en los pacientes tratados con Combigan® vs los tratados con Alphagan®.

En cuanto a los subtipos de linfocitos T, cooperadores o Th (CD3+CD4+) y citotóxicos o Tc (CD3+CD8+), nuestros resultados mostraron que ambos subtipos responden de modo diferente a los anti-glaucomatosos tópicos, ya que los Th se elevaron significativamente en la visita 12 para los tratados con Combigan®, mientras que los Tc lo estaban en la visita 9 en los tratados con Alphagan®. Estos datos apoyarían la hipótesis protectora del betabloqueante; pero, también, observamos que su efecto no aparece de forma inmediata sino que precisa un tiempo para su instauración. Si bien, no se aprecian apenas cambios en el cociente CD4/CD8, que es sin duda el parámetro inmunológico celular más relevante de todos los estudiados, ya que se trata de un parámetro muy sensible a cambios intrínsecos y ambientales.

En el grupo tratado con Combigan®, además se eleva significativamente la proporción de linfocitos B en la visita 9. Y además en este punto temporal, el % de estas células es significativamente diferente entre ambos grupos de pacientes. Ambos fármacos, por tanto, consiguen alterar los porcentajes de linfocitos T y B en las vistas 9 y 12, dato que queda mejor reflejado en el cociente T/B que es significativamente inferior en los sujetos tratados con Combigan® en las visitas 9 y 12; dato que de nuevo podría estar relacionado con el efecto protector del betabloqueante.

En definitiva, en ambos grupos existe un incremento de linfocitos Tc, más importante en los pacientes tratados con Alphagan® lo que también podría explicar el mayor número de fenómenos inflamatorios que sufren estos pacientes.

#### **5.C.4.2. Viabilidad**

Respecto a la viabilidad celular, los resultados, referentes al total de células conjuntivales analizadas, demostraron la existencia de dos poblaciones celulares distintas: por una lado, una población mayoritaria, 72,65% (Grupo I) y 74,25% (Grupo II), que estaría compuesta por células grandes, complejas y de baja viabilidad; es decir, la mayoría de las células se encuentran en apoptosis, ya sea temprana, 41,28% y 51,48% o tardía, 36,08% y 31,58%, respectivamente; y por otro lado, se observó una población más escasa, 19,09% (Grupo I) y 21,47% (Grupo II), compuesta de células pequeñas, menos complejas, pero con mayor viabilidad (65,8% y 68,92% respectivamente).

Estos resultados son muy similares a los obtenidos por otros estudios que comparan las células obtenidas de otras zonas topográficas de la conjuntiva, en particular: zonas tarsal y bulbar superiores.(5,50,134) Otros autores han observado, utilizando la técnica de citología por impresión conjuntival, que más del 30% de las células recuperadas de la SO humana se encuentran en apoptosis al ser positivas para el marcador APO2-7.(138)

A la luz de estos resultados, se podría interpretar que la población celular mayoritaria correspondería fundamentalmente a las células epiteliales, mientras que dentro de la población de células simples y menos numerosas estaría la población leucocitaria; además, otra posible explicación de la existencia de estas dos poblaciones celulares claramente diferenciadas por parámetros intrínsecos (como son el tamaño y su complejidad o granularidad citoplasmática) se deba a que las células más viables provengan de capas más profundas del epitelio y, por eso estén menos diferenciadas (y tengan menor tamaño y granularidad).

Este ensayo nos ha permitido demostrar que ambos fármacos son capaces de producir un descenso en el porcentaje de células simples y un aumento de las complejas; ambos fármacos producirían un aumento en la apoptosis celular, pero en los pacientes tratados con Alphagan® se aprecia sobre todo en la apoptosis tardía; mientras que en los tratados con Combigan® se aprecia en la apoptosis temprana; de nuevo este dato es concordante con el efecto protector, a corto-medio plazo, del betabloquante.

Ambos fármacos producen un ligero aumento del porcentaje de células muertas complejas, que se aprecia en las visitas 3, 6, 9 y 12 para los tratados con Combigan®; y en las vistas 6, 9 y 12 para los tratados con Alphagan®.

#### **5.C.4.3.Ciclo celular**

El tercer aspecto analizado mediante citometría de flujo fue el contenido de ADN de las células conjuntivales recuperadas por citología de cepillado. El uso del citómetro de flujo para contabilizar el DNA celular y así diferenciar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células ha sido ampliamente utilizado.(5)

La mayor parte de las células analizadas mediante esta técnica se encontraban en fase de crecimiento o preciclo (% G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>), seguidas de aquellas con capacidad proliferativa ( G<sub>2</sub>/M). Estos resultados no difieren de los obtenidos en otros estudios realizados sobre conjuntivas sanas y conjuntivas con pterigium o de sistema inmunitariopacientes en tratamiento para el glaucoma. (139-141) En estudios previos se había publicado que en individuos sanos, el 80% de las células se encontraban en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, el 14% en fase S y el 5% en fase G<sub>2</sub>/M .(5,50,134)

Respecto a esta última fase del ciclo, G<sub>2</sub>/M, se observó que aumentaba significativamente en las visitas 6 y 9 en los sujetos tratados con Combigan®; dato que sugeriría, de nuevo, el posible efecto protector del betabloquante, puesto que significa que hay mayor proporción de células en mitosis, o con el DNA completamente duplicado.

Por último, al analizar el MPI (que aúna células en fase S y células en mitosis), se observó, que igual que en el parámetro anterior, estaba significativamente aumentado en los sujetos tratados con Combigan® en las visitas 6 y 9.



## 6. CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo que se acaban de presentar y discutir, permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se confirma un mayor efecto hipotensor del Combigan® frente al Alphagan® en periodos cortos de tratamiento (3 meses), ya que a medio-largo plazo las potencias se equiparan.
2. Los tratamientos tópicos antiglaucomatosos, Alphagan® y Combigan®, inducen un empeoramiento en algunos de los indicadores de inflamación de los pacientes tratados (incluso compatibles con el diagnóstico de un síndrome de ojo seco secundario).
3. Se confirma la falta de correlación entre diferentes indicadores de inflamación de la superficie ocular, en particular entre las pruebas subjetivas (cuestionarios) y las pruebas funcionales clásicas (NIBUT y/o Schirmer).
4. El preparado comercial que combina en su composición un alfa-2-agonista y un beta-bloqueante (Combigan®) es menos lesivo sobre la superficie ocular a corto-medio plazo, al ocasionar menor número y/o intensidad de procesos inflamatorios.
5. Se confirma la utilidad de las técnicas de biología molecular y citometría de flujo en el estudio de la superficie ocular, fundamentalmente para el estudio simultáneo de múltiples parámetros moleculares (citocinas y/o RNA mensajero) y/o celulares (fenotipo y viabilidad celular) en muestras tan escasas como las lágrimas o las citologías conjuntivales por cepillado.
6. Considerando que el uso prolongado de estos fármacos tópicos anti-glaucomatosos juega un papel importante en la aparición de fenómenos inflamatorios, la menor toxicidad del Combigan® a corto-medio plazo puede deberse a, alguno o varios, de los siguientes motivos:
  - a. Combigan® produce un aumento global mayor (tendencia sin alcanzar la significación estadística) de la expresión de los receptores alfa-adrenérgicos; lo que justificaría el menor número de reacciones inflamatorias conjuntivales en fases precoces del tratamiento.
  - b. Alphagan® presentó un aumento en la visita 12 de la expresión de citocinas proinflamatorias (eotaxina, fractalquina, IP-10, Rantes, IL-6, IL8, VEGF ó IL-1  $\beta$ 1), datos que explicarían la “mala” tolerancia del fármaco a lo largo del tratamiento.
  - c. Ambos fármacos modifican el fenotipo de los linfocitos intraepiteliales conjuntivales incrementando la proporción de linfocitos Tc, lo que refleja una mayor respuesta inflamatoria tipo Th1 en el epitelio; este aumento es más importante en los pacientes

tratados con Alphagan® explicando, así, la mayor intensidad de indicadores inflamatorios en este grupo de tratamiento.

- d. Ambos fármacos disminuyen la viabilidad celular del epitelio conjuntival ocular, produciendo un descenso en el porcentaje de células simples y un aumento de las complejas junto a un aumento en la apoptosis celular; los pacientes tratados con Combigan® presentan sobre todo una mayor viabilidad de células complejas a corto-medio plazo, lo que sugiere un efecto protector del betabloquante.
- e. Ambos fármacos alteran el ciclo celular del epitelio conjuntival ocular, siendo Combigan® el que produce un aumento de la capacidad proliferativa epitelial en las visitas 6 y 9; sugiriendo, de nuevo, un efecto menos lesivo a corto-medio plazo debido al betabloquante.



# 7. BIBLIOGRAFÍA

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Weinreb RN, Friedman DS, Fechtner RD et al. Risk assesment in the management of patients with ocular hipertensión. *Am J Ophthalmol.* 2004; 138: 458-467.
2. Hoying PF, van Beek LM. Pharmacological therapy for glaucoma: a review. *Drugs.* 2000; 59: 411-434.
3. Enriquez-de-Salamanca A, Siemasko KF, Diebold Y et al. Expresión of Muscarinic and Adrenergic receptors in Normal Human Conjuntival Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 504-513.
4. Diebold Y, Enriquez de Salamanca A, Calonge M et al. Alpha2-adrenergic receptors are present in normal human conjunctiva. *Curr Eye Res.* 2005; 30:1121-1129.
5. Reinoso R, Martin-Sanz R, Martino M et al. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and inthaepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *Mucosal Immunology.* 2012;5(4):455-67.
6. Sherwood MB, Craven ER, Chou C et al. Twice-daily 0.2% brimonidine-0.5% fixed combination therapy vs monotherapy with timolol or brimonidine in patients with glaucoma or ocular hypertension: a 12 month randomized trial. *Arch. Ophthalmol.* 2006;124:1230-8.
7. Herreras JM, Pastor JC, Calonge M, et al. Ocular surface alteration after long-term treatment with an antiglaucomatous drug. *Ophthalmology.* 1992 ;99:1082-1088.
8. Guyton. *Tratado de Fisiología Médica.* Ed Elsevier España. 2006.
9. Florez J. *Farmacología humana.* Ed Masson. 2008.
10. Ruffolo RR Jr., Hieble JP. Alfa.Adrenoceptors. *Pharmacol Ther.* 1994; 61:1-64.
11. Limbird LE. Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: Additional signalling mechanisms. *FASEB J.* 1988; 2: 2686-2695.
12. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994; 46: 121-136.
13. Bylund DB, Blaxall HS, Iversen LJ. Pharmacological characteristics of alpha 2-adrenergic receptors. Comparison of pharmacologically defined subtypes with subtypes identified by molecular cloning. *Mol Pharmacol.* 1992 Jul; 42:1-5.
14. Maze M, Tranquilli W. Alpha 2 adrenoceptor agonists: defining the role in clinical anesthesia. *Anesthesiology.* 1991; 74: 581-605
15. Yaksh TL. Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacol Biochem Behav.* 1985; 22: 845-858.
16. Lee DA, Topper JE, Brubaker RF. Effect of clonidine on aqueous humor flow in normal human eyes. *Exp Eye Res.* 1984; 38:239-249.
17. Lomasney J, Lorenz W, Allen L. Expansion of the alpha-2 adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human alpha-2 adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl acad Sci. USA.* 1990; 87: 5094-5098.
18. Berkowitz DE, Price DT, Bello EA. Localization of messenger RNA for three distinct alpha-2 adrenergic receptor subtypes in human tissues. Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology. *Anesthesiology* 1994; 81: 1235-1244.
19. Huang Y, Gil DW, Vbtyanscheeuwijck P. Localization of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the anterior segment of the eye with selective antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: 2729-2739.
20. Bylund DB, Chacko DM. Characterization of alpha 2 adrenergic receptor subtypes in human ocular tissue homogenates. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 2299-2306.
21. Chiou GC. Effects of alpha 1 and alpha 2 activation of adrenergic receptors on aqueous humor dynamics. *Life sci.* 1983; 32: 1699-1704.
22. Carlos Cortés Valdés, Alfonso Arias Puente, José Luis Encinas Martín, Julián García Feijoó. *Farmacología Ocular.* Ed. Sociedad Española de Oftalmología. 2007
23. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on ClinicalTrials in Dry Eyes. *CLAO J* 1995; 21:221-232.
24. 2007 Report of the International Dry Eye WorkShop (DEWS). *The Ocular Surface.* 2007; 5: 63-204.
25. Plufelger,SC; Beuerman RW; Stern ME. *Dry eye and ocular surface disorders.*2004
26. Benítez del Castillo JM, Durán de la Colina J, Rodríguez Ares MT. *Superficie Ocular.* LXXX ponencia oficial de la Sociedad Española de Oftalmología. 2004.
27. Krachmer, Jay H. *Cornea.* Ed. Elsevier. 2010.
28. Prydal JI, Artal P, Woon H, Campbell FW. Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2006-2011.
29. Argueso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res* 2001;73:281-289.
30. Moniaux N, Escande F, Porchet N et al. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001; 6:1192-1206.
31. Baudouin C. Side effects of antiglaucomatous drugs on the ocular surface. *Curr Opin Ophthalmol.* 1996; 7:80-86.
32. Broadway D, Grierson I, Hitchings R. Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva. *Br J Ophthalmol.* 1993; 77:590-596.
33. Broadway D, Grierson I, O'Brien C et al. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. I. The conjunctiva cell profile. *Arch Ophthalmol.* 1994; 112:1437-1445.

34. Mietz H, Niesen U, Krieglstein GK. The effect of preservatives and antiglaucomatous medication on the histopathology of the conjunctiva. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1994; 232:561-565.
35. Cook EB, Sthal JL, Lowe L et al. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs non allergics. *J Immunol Methods*. 2001; 254:109-118.
36. Barton K, Monroy DC, Nava A et al. Inflammatory cytokines in the tears of patients with ocular rosacea. *Ophthalmology*. 1997; 104:1868-1874.
37. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res*. 1999; 19:201-211.
38. Enriquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern M et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010;16:862-873.
39. Suzuki K, Suzuki Y, Matsumoto M et al. Expression profile of intravitreal cytokines, chemokines and growth factors in patients with Fuchs Heterochromic iridocyclitis. *Case Report Ophthalmol*. 2010; 1:5-13.
40. Kim TW, Chung H, Yu HG. Chemokine expression of intraocular lymphocytes in patients with Behçet uveitis. *Ophthalmic Res*. 2011; 45:5-14.
41. Kim JT, Lee SH, Chun YS et al. Tear cytokines and chemokines in patients with demodex blepharitis. *Cytokine*. 2011;53 :94-99.
42. Kaneda S, Miyazaki D, Sasaki SI et al. Multivariate analyses of inflammatory cytokines in eyes with branch retinal vein occlusion: relationships to bevacizumab treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:2982-2988.
43. Paulsen F. Functional anatomy and immunological interactions of ocular surface and adnexa. *Dev Ophthalmol*. 2008; 41:21-35.
44. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy*. 2007; 92:36-49.
45. Knop E, Knop N. Influence of the eye-associated lymphoid tissue (EALT) on inflammatory ocular surface disease. *Ocul Surface* 2005; 3:180-186.
46. Knop E, Knop N. A functional unit for ocular surface immune defense formed by the lacrimal gland, conjunctiva and lacrimal drainage system. *Adv Exp Med Biol*. 2002; 506:835-844.
47. Sullivan DA. Ocular mucosal immunity. Ed *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic Press; 1999;1241-1281.
48. Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat* 2005; 206:271-285.
49. Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1270-1279.
50. Knop E, Knop N. Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in the human eye – Components and topographical distribution. *Ophthalmic Res*. 1999; 3:11-56.
51. Dua HS, Gomes JA, Jindal VK et al. Mucosa specific lymphocytes in the human conjunctiva, corneoscleral limbus and lacrimal gland. *Curr Eye Res* 1994;13:87-93.
52. Hingorani M, Metz D, Lightman SL. Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population. *Exp Eye Res* 1997; 64:905-912.
53. Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ et al. The role of conjunctival epithelial cells in chronic ocular allergic disease. *Exp Eye Res* 1998; 67:491-500.
54. Stern ME, Siemasko KF, Niederkorn J. The Th1/Th2 paradigm in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005; 5:446-450.
55. Knop E, Knop N, Claus P. Local production of secretory IgA in the Eye-Associated Lymphoid Tissue (EALT) of the normal human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:2322-2329.
56. Herreras JM, Perez S, Perez H et al. Influence of topical anesthesia on tests diagnostic of blepharitis-associated dry eye syndrome. *Ocul Immunol Inflamm*. 1997; 5:33-41.
57. McMonnies CW. Key questions in a dry eye history. *J Am Optom Assoc*. 1986; 57:512-517.
58. McMonnies CW, Ho A. Responses to a dry eye questionnaire from a normal population. *J Am Optom Assoc*. 1987; 58:588-91.
59. Cho P, Yap M. Schirmer test. II. A clinical study of its repeatability. *Optom Vis Sci*. 1993; 70:157-159.
60. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea*. 1998; 17:38-56.
61. Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol*. 2001;45:221-226.
62. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969;82:10-14.
63. Saez V, Corrales RM, Calonge M et al. A modified staining protocol enables light microscopy evaluation of conjunctival impression cytology samples collected by polyethersulfone filter paper. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42:487.
64. Calonge M, Diebold Y, Saez V et al. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res*. 2004; 78:457-72.
65. Corrales RM, Calonge M, Herreras JM et al. Levels of mucin gene expression in normal human conjunctival epithelium in vivo. *Curr Eye Res*. 2003; 27:323-328.
66. Sijssens K.M. Distinct Cytokine Patterns in the Aqueous Humor of Children Adolescents and Adults with Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2006; 16:211-216.
67. Carreño E, Enriquez-de-Salamanca A, Teson M et al. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Ophthalmol*. 2010; 88:250-258.
68. Brinole-Baudouin F, Ott AC, Warnet JM et al. Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies. *Exp Eye Res*. 2004; 78:473-481.

69. Fujihara T, Takeuchi T, Saito K et al. Evaluation of human conjunctival epithelium by a combination of brush cytology and flow cytometry: an approach to the quantitative technique. *Diagn Cytopathol.* 1997; 17:456-460.
70. Fujihara T, Takeuchi T, Saito K et al. Flow cytometric analysis of surface antigens on human conjunctival epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 1997; 29:103-109.
71. Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ et al. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:642-652.
72. Baudouin C, Labbé A, Liang H et al. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29:312-334.
73. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. 1995; 21:221-32.
74. Brignole F, Auzerie O, Baudouin C. Apoptosis and the ocular surface. *J Fr Ophtalmol.* 2003; 26:299-306.
75. Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45:221-226.
76. Nichols KK, Nichols JJ, Zadnik K. Frequency of dry eye diagnostic test procedures used in various modes of ophthalmic practice. *Cornea.* 2000; 19:477-482.
77. McMonnies CW, Ho A. Responses to a dry eye questionnaire from a normal population. *J Am Optom Assoc.* 1987; 58:588-91.
78. Nichols KK, Begley CG, Caffery B et al. Symptoms of ocular irritation in patients diagnosed with dry eye. *Optom Vis Sci.* 1999; 76:838-844.
79. Fuentes-Páez G, Herreras JM, Cordero Y et al. Falta de concordancia entre los cuestionarios para el síndrome de ojo seco y las pruebas diagnósticas. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2011; 86:3-7.
80. Rodríguez-Galietero A, González Martínez JV, Cristóbal Bescós JA. Use of Brimonidine Before LASIK With Femtosecond Laser-created Flaps for the Correction of Myopia: A Contralateral Eye Study. *Journal of Refractive Surgery.* 2010; 26:28-32.
81. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res.* 1985; 4:1-7.
82. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR et al. Effect of fluorescein instillation on the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res.* 1985; 4:9-12.
83. Mengher LS, Pandher KS, Bron AJ. Non-invasive tear film break-up time: sensitivity and specificity. *Acta Ophthalmol.* 1986; 64:441-444.
84. Cho P, Leung L, Lam A et al. Tear break-up time: clinical procedures and their effects. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1998; 18:319-324.
85. Korb DR. Survey of preferred tests for diagnosis of the tear film and dry eye. *Cornea.* 2000; 19:483-486.
86. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea.* 1998; 17:38-56.
87. Cho P, Yap M. Schirmer test. I. A review. *Optom Vis Sci.* 1993; 70:152-156.
88. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea.* 2003; 22:640-650.
89. Korb DR. Survey of preferred tests for diagnosis of the tear film and dry eye. *Cornea.* 2000; 19:483-486.
90. Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. Performance and repeatability of the NEI-VFQ-25 in patients with dry eye. *Cornea.* 2002; 21:578-583.
91. Feenstra RP, Tseng SC. Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology.* 1992; 99:605-617.
92. Stewart WC, Stewart JA, Jenkins JN et al. Corneal punctate staining with latanoprost, bimatoprost, and travoprost in healthy subjects. *J Glaucoma.* 2003; 12:475-479.
93. Feenstra RP, Tseng SC. What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol.* 1992; 110:984-993.
94. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol.* 1969; 82:10-14.
95. Stuchell RN, Farris RL, Mandel ID. Basal and reflex human tear analysis. II. Chemical analysis: lactoferrin and lysozyme. *Ophthalmology.* 1981; 88:858-861.
96. Stuchell RN, Feldman JJ, Farris RL et al. The effect of collection technique on tear composition. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984; 25:374-377.
97. Pandit JC, Nagyova B, Bron AJ et al. Physical properties of stimulated and unstimulated tears. *Exp Eye Res.* 1999; 68:247-253.
98. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol.* 1977; 84:798-801.
99. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea.* 1988; 7:71-81.
100. Martinez AJ, Mills MB, Jaceldo KB et al. Standardization of conjunctival impression cytology. *Cornea.* 1995; 14:515-522.
101. Rolando M, Terragna F, Giordano G et al. Conjunctival surface damage distribution in keratoconjunctivitis sicca. An impression cytology study. *Acta Ophthalmol.* 1990; 200:170-176.
102. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A et al. Topographical distribution of ocular surface cells by the use of impression cytology. *Acta Ophthalmol.* 1991; 69:371-376.
103. Meller D. The fine structure of chromatin alterations in conjunctival epithelial cells in keratoconjunctivitis sicca. *Cornea.* 1999; 18:225-232.
104. Yeo AC, Carkeet A, Carney LG et al. Relationship between goblet cell density and tear function tests. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2003; 23:87-94.
105. Rivas L, Rodriguez JJ, Alvarez MI et al. Correlation between impression cytology and tear function parameters in Sjogren's syndrome. *Acta Ophthalmol.* 1993; 71:353-359.
106. Matsuo T, Cynader MS. Localization of alpha-2 adrenergic receptors in the human eye. *Ophthalmic Res.* 1992; 24:213-219.

107. Huang Y, Gil DW, Vanscheeuwijck P et al. Localization of alpha2-adrenergic receptor subtypes in the anterior segment of the eye with selective antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:2729-2739.
108. Bylund DB, Chacko DM. Characterization of  $\alpha_2$  adrenergic receptor subtypes in human ocular tissue homogenates. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:2299-2306.
109. Elena PP, Kosina-Boix M, Denis P et al. Alpha2-adrenergic receptors in rat and rabbit eye: a tritium-sensitive film autoradiography. *Ophthalmic Res.* 1989; 21:309-314
110. Bylund DB, Laurie JI, William JM et al. Characterization of alpha-2D adrenergic receptor subtypes in bovine tissue homogenates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 281:1171-1177.
111. Wikberg-Matsson A, Wikeberg JE, Uhlen S. Characterization of alpha 2-adrenoceptor subtypes in the porcine eye: identification of alpha 2A-adrenoreceptors in the choroid, ciliary body and iris and alpha 2A and alpha 2C-adrenoceptors in the retina. *Exp Eye Res.* 1996; 63:57-66.
112. Wilensky JT. The role of brimonidine in the treatment of open-angle glaucoma. *Survey Ophthalmol.* 1996; 41:19-26.
113. Chacko DM, Camras CB. The potential of  $\alpha_2$ -adrenergic agonists in the medical treatment of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol.* 1994; 5:76-84.
114. Wheeler LA, Woldemussie E. Alpha-2 adrenergic receptor agonists are neuroprotective in experimental models of glaucoma. *Eur J Ophthalmol.* 2001; 11:30-35.
115. Greenfield DS, Liebmann JM, Ritch R. Brimonidine: a new alpha2-adrenoceptor agonist for glaucoma treatment. *J Glaucoma.* 1997; 6:250-258.
116. Geyer O, Schmidt KG, Pianka P et al. Clonidine provides an allergy free alternative in glaucoma patients with proven allergy to apraclonidine. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2000; 238:149-152.
117. Williams GC, Orengo-Nania S, Gross RL. Incidence of brimonidine allergy in patients previously allergic to apraclonidine. *J Glaucoma.* 2000; 9:235-238.
118. G.R. Wallace. The role of chemokines and their receptors in ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2004; 23: 435-448.
119. D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P., Sinigaglia F. Chemokine receptors in inflammation, an overview. *J. Immunol. Meth.* 2003; 273:3-13.
120. Enriquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J et al. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: An in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine.* 2008; 44:160-167.
121. Lopez-Souza N, Avila PC, Widdicombe JH. Polarized cultures of human airway epithelium from nasal scrapings and bronchial brushings. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003; 39:266-269.
122. Lane C, Burgess S, Kicic A et al. The use of non-bronchoscopic brushings to study the paediatric airway. *Respir Res.* 2005; 6:53.
123. Toskala E, Haataja J, Shirasaki H et al. Culture of cells harvested with nasal brushing: a method for evaluating ciliary function. *Rhinology.* 2005; 43:121-124.
124. Fossum M, Gustafson CJ, Nordenskjold A et al. Isolation and in vitro cultivation of human urothelial cells from bladder washings of adult patients and children. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2003; 37:41-45.
125. Fossum M, Lundberg F, Holmberg K et al. Long-term culture of human urothelial cells--a qualitative analysis. *Cells Tissues Organs.* 2005; 181:11-22.
126. Priebe M, Paulsen F, Jahnke T et al. Mechanical brush-catheter abrasion method for the isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. First in vitro results. *Rofo* 2001; 173:955-958.
127. Fitzgerald RC, Farthing MJ, Triadafilopoulos G. Novel adaptation of brush cytology technique for short-term primary culture of squamous and Barrett's esophageal cells. *Gastrointest Endosc.* 2001; 54:186-189.
128. Corrales RM, Calonge M, Herreras JM et al. Human epithelium from conjunctival impression cytology expresses MUC7 mucin gene. *Cornea.* 2003; 22:665-671.
129. Corrales RM, Galarreta DJ, Herreras JM et al. Normal human conjunctival epithelium expresses MUC13, MUC15, MUC16 and MUC17 mucin genes. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2003; 78:375-381.
130. Diebold Y, Corrales RM, Calonge M et al. Human conjunctival epithelium in culture: a tool to assay new therapeutic strategies for dry eye. *Adv Exp Med Biol.* 2002; 506:307-311.
131. Yagmur M, Ersoz C, Reha Ersoz T et al. Brush technique in ocular surface cytology. *Diagnostic Cytopathology.* 1997; 2:88-91.
132. Diebold Y, Calonge M, Enriquez-de-Salamanca A et al. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:4263-74.
133. De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells.* 2006; 24:368-375.
134. Martínez-Osorio H, Calonge M, Corell A et al. Characterization and short-term culture of cells recovered from human conjunctival epithelium by minimally invasive means. *Mol vis.* 2009; 15:2185-2195.
135. Fujishima H, Saito I, Takeuchi T et al. Immunological characteristics of patients with vernal keratoconjunctivitis. *Jpn J Ophthalmol.* 2002; 46:244-248.
136. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM et al. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells.* 2005; 23:1266-1275.
137. Romano AC, Espana EM, Yoo SH et al. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:5125-5129.
138. Brignole F, De Saint-Jean M, Goldschild M et al. Expression of Fas-Fas ligand antigens and apoptotic marker APO2.7 by the human conjunctival epithelium. Positive correlation with class II HLA DR expression in inflammatory ocular surface disorders. *Exp Eye Res.* 1998; 67:687-697.

139. Pozarowaska D, Pozarowaki P. Cytometry Cytometric Assessment of Cytostatic and Cytotoxic Effects of Topical Glaucoma Medications on Human Epithelial Corneal Line Cells. *Cytometry*. 2010; 78:130-137.
140. Baudouin C, Liang H. The Ocular Surface of Glaucoma Patients Treated over the Long Term Expresses Inflammatory Markers Related to Both T-Helper 1 and T-Helper 2 Pathways. *Ophthalmology*. 2008; 115:109-115.
141. Karukonda SR, Thompson HW, Beuerman RW et al. Cell cycle kinetics in pterygium at three latitudes. *Br J Ophthalmol*. 1995; 79:313-317.





## 8. ABREVIATURAS

## 8. ABREVIATURAS

Ach	Acetil-colina
Adr	Adrenalina
CALT	<i>Conjunctiva-associated lymphoid tissue</i>
CIC	Citología por impresión conjuntival
DE	Desviación estándar
IDDM	<i>insulin-dependent diabetes mellitus</i>
EALT	<i>Eye-associated lymphoid tissue</i>
EEM	Error estándar de la media
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FC	<i>Flow Cytometry</i>
FMI	Intensidad de fluorescencia media
GM-CSF	Factor estimulador colonias granulocitos y macrófagos
HTO	Hipertensión ocular
HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valladolid
IELs	<i>intraepithelial lymphocytes</i>
IL	Interleucina
IMAOs	Inhibidores de la monoaminoxidasa
INF	Interferón
IOBA	Instituto de Oftalmobiología Aplicada
KDa	Kilodaltons
NA	Noradrenalina
ml	mililitro
MPI	Índice de mieloproliferación
MUC	Mucina
μl	microlitro
NIBUT	Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo
NK	<i>Natural killer</i>
NOG	Neuropatía óptica glaucomatosa
OMIS	<i>Ocular mucosal immune system</i>
PAS	Acido periódico de Schiff
PES	Polietersulfona
PIO	Presión o tensión intraocular
PL	Película lagrimal
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SN	Sistema nervioso
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNAS	Sistema nervioso autónomo simpático
SNAP	Sistema nervioso autónomo parasimpático

SNC	Sistema nervioso central
SO	Superficie ocular
SOS	Síndrome de ojo seco
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UFL	Unidad funcional lagrimal
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
xMAP	<i>Multi Analyte Profiling</i>
YAG	<i>yttrium aliminium garnet</i>

*Anexo I: Secuencia de Exploración*



**PROYECTO COMBIGAN  
HOJA RECOGIDA DATOS**

PACIENTE:  N° PACIENTE:

OJO:

CLAVE PACIENTE: N°:  OJO:  MES:

EDAD:  SEXO: H M

FÁRMACO EMPLEADO: ALPHAGAN COMBIGAN

SEGUIMIENTO (meses): 0 3 6 9 12 15

Encuesta clínica estandarizada: Symptoms of discomfort questionnaire (Allergan protocol)

Sequedad		Escala de puntuación:
Sensación de cuerpo extraño en el ojo		0= no he sentido el síntoma
Quemazón/ escozor		1= rara vez he sentido el síntoma, pero no es molesto
Dolor		2= alguna vez he sentido el síntoma, me causa molestias pero no interfiere en mis actividades
Picor		3= siempre siento este síntoma, me causa molestias pero no interfiere en mis actividades
Sensibilidad a la luz		4= siempre siento este síntoma, me causa molestias y además interfiere en mis actividades
Visión borrosa		
Otros (especificar)		

NIBUT:  seg.

LÁGRIMA:  
(2capilares= 4µl de cada ojo)  LUMINEX/CONGELAR.

LISOZIMA:  mgr/ml.

## ANESTESIA TÓPICA




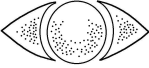
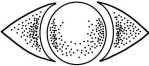
TEST SCHIRMER:  mm/5min.

C.I.C. AP: GRADO   
(2 medios filtros  
conj. Bulbar Inferior) BM:  $\alpha$ 2a  $\alpha$ 2b  $\alpha$ 2c Mucinas

BRUSH CONJUNTIVAL:

TEST FLUORESCEINA:

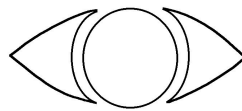
Escala de Oxford.

- A  Grado 0: Tinción igual o menor a figura A.
- B  Grado 1: Tinción mayor a figura A y menor o igual que B.
- C  Grado 2: Tinción mayor a figura B y menor o igual que C.
- D  Grado 3: Tinción mayor a figura C y menor o igual que D.
- E  Grado 4: Tinción mayor a figura D y menor o igual que E.

P.I.O.:  (mmHg)

TEST ROSA BENGALA:

Escala de van Bijsterveld



Grado 0-3 Grado 0-3 Grado 0-3

## ***Anexo II: Consentimiento informado***

**Estudio de la influencia del tratamiento tópico conjuntival con brimonidina y con un preparado combinado de brimonidina y timolol sobre los receptores adrenérgicos, y su relación con los síntomas y signos de inflamación conjuntival.**

D/Dña. \_\_\_\_\_ con DNI  
núm \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_ provincia de  
\_\_\_\_\_ manifiesto que he sido informado/a por \_\_\_\_\_ sobre los  
siguientes aspectos en cuanto a la utilización de colirios para el control de la PIO y al estudio del  
cual voy a entrar a formar parte:

1. He sido informado/a sobre el uso de utilización de colirios para el control de la PIO.
2. He podido hacer preguntas sobre el estudio.
3. He recibido suficiente información sobre el estudio.
4. Entiendo que el uso de colirios en general tiene muchos beneficios, pero que no está exento de riesgos. Un pequeño porcentaje de usuarios desarrollan complicaciones potencialmente muy serias, que pueden ocasionar daño permanente en el ojo y pérdida de visión.
5. Mi cooperación es vital. Entiendo la importancia del buen uso de los colirios y he sido instruido propiamente en ello, y de las revisiones periódicas que se me realizarán, tanto previamente como posteriormente a la indicación del tratamiento.
6. He sido informado del correcto uso de los colirios y de las condiciones que debo cumplir para formar parte del estudio, comprometiéndome a avisar al investigador si en algún momento no cumplo cualquiera de las condiciones reflejadas en los criterios de inclusión y exclusión.
7. En cualquier momento puedo dejar de participar en el estudio, sin tener que dar explicaciones sobre ello a cualquiera de los componentes del equipo investigador, sin que ello repercuta en mis cuidados médicos.

Por lo que declaro que todas mis dudas y preguntas han sido aclaradas, que he comprendido toda la información que se me ha proporcionado. Por ello doy mi consentimiento para participar en el estudio.

Estoy de acuerdo en que mis datos personales relativos a este estudio sean almacenados, procesados electrónicamente y transmitidos, con propósitos de analizarlos. Doy mi consentimiento para que el personal autorizado del IOBA o las autoridades sanitarias revisen que el estudio se está llevando a cabo de manera correcta e inspeccionen mi historial referente a mi colaboración en el estudio.

Así mismo autorizo al investigador a que revele la información necesaria recogida en el estudio para que pueda ser procesada y difundida a la comunidad científica, sin que en ningún momento sea revelada mi identidad.

En Valladolid, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Firma del paciente

Firma del testigo

Firma del investigador

